Tjáning TTF-1, CK7 og CK20 með mótefnalitun í mismunandi krabbameinum

Bjarney Sif Kristinsdóttir

Ritgerð til diplómaprófs
Háskóli Íslands
Læknadeild
Námsbraut í lífeindafræði
Heilbrigðisvísindasvið

HÁSKÓLI ÍSLANDS

Tjáning TTF-1, CK7 og CK20 með mótefnalitun í mismunandi krabbameinum

Bjarney Sif Kristinsdóttir

Ritgerð til diplómaprófs á meistarastigi í lífeindafræði

Umsjónarkennari: Martha Á. Hjálmarsdóttir

Leiðbeinendur: Jón Gunnlaugur Jónasson, Sigurrós Jónasdóttir og Bjarni A. Agnarsson.

Læknadeild

Námsbraut í lífeindafræði

Heilbrigðisvísindasvið Háskóla Íslands

Júní 2013

Ritgerð þessi er til diplómaprófs á meistarastigi í lífeindafræði og er óheimilt að afrita ritgerðina á nokkurn hátt nema með leyfi rétthafa.

© Bjarney Sif Kristinsdóttir 2013

Prentun: Samskipti

Reykjavík, Ísland 2013

Ágrip

Inngangur: Mótefnalitanir hafa verið notaðar við greiningar á krabbameinum í mörg ár og er mjög mikilvæg rannsóknaraðferð til þess að geta gefið auknar upplýsingar við venjubundið mat á útliti vefjarins. Mótefnalitanir á vefjum hafa einnig verið notaðar til þess að hjálpa meinafræðingum við mat á meinvörpum m.t.t. líklegs upphafsstaðs æxlis, einkum litanir með CK7 og CK20. Þessi greining getur hinsvegar verið erfið þar sem mótefni eru ekki sértæk eða fullkomlega næm fyrir staðsetningu meinsins. TTF-1 er mótefni sem talið var mjög sértækt og næmt í þessum tilgangi, einkum í lungnakrabbameini og skjaldkirtilskrabbameini en vísbendingar hafa þó komið undanfarið um að ekki sé um eins sértæka eða næma mótefnalitun að ræða og áður var talið.

Markmið: Megin markmið rannsóknarinnar var að auka skilning á breytileika í litunarniðurstöðum með því að athuga litamynstur í mismunandi æxlum með mótefnunum TTF-1, CK7 og CK20, sem eru þær megin mótefnalitanir sem nú eru í notkun til hjálpar meinafræðingum við ákvörðun upphafsstaðar æxlis.

Efni og aðferðir: Fundin voru fram 61 krabbamein á Rannsóknarstofu í meinafræði á LSH og þau lituð með mótefnunum TTF-1, CK7 og CK20 auk þess sem H&E litun var framkvæmd á öllum sýnum. Æxlistegundir sem notaðar voru við rannsóknina voru lungnakrabbamein (smáfrumu-, kirtilmyndandi-, flöguþekju- og stórfrumukrabbamein), nýrnakrabbamein, ristilkrabbamein, brjóstakrabbamein, briskrabbamein, magakrabbmein, blöðruhálskirtilskrabbamein og eggjastokkakrabbamein (endometrioid, serous og mucinous). Sýnin voru metin eftir styrkleika og dreifanleika litunarinnar í fjóra mismunandi flokka: sterk og dreifð litun, sterk og staðbundin litun, veik og dreifð litun og veik og staðbundin litun.

Niðurstöður: Tjáning TTF-1 greindist í smáfrumukrabbameini, kirtilmyndandi krabbameini og stórfrumukrabbameini í lungum í 80-83% tilfella en í 20% tilfella í flöguþekjukrabbameini. Einnig var TTF-1 að greinast jákvætt í briskrabbameini (20%), magakrabbameini (20%), blöðruhálskirtilskrabbameini (40%) og í endometrioid (66%), serous (50%) og mucinous æxlum eggjastokka. Tjáning CK7 greindist í 100% tilfella í kirtilmyndandi krabbameini og stórfrumukrabbameini lungna ásamt brjóstakrabbameini en engin tjáning CK7 greindist í ristilkrabbameini. Í nýrnakrabbameinum var CK7 jákvætt í 80% tilfella og í mucinous æxlum eggjastokka í 66% tilfella. Í fjórum af fimm vefjasýnum frá blöðrhálskirtilskrabbameini reyndust æxlin neikvæð fyrir CK7 en mestur hluti af eðlilegum blöðruhálskirtilsvef var að litast sterkt jákvæður. CK20 sýndi fram á tjáningu í lungnakrabbameinum (kirtilkrabbameini 20% og stórfrumukrabbameini 20%) og töluvert hátt hlutfall greindist í magakrabbameinum (80%). CK20 var jákvætt í 100% tilfella í ristilkrabbameini og mucinous æxlum eggjastokka.

Ályktun: Niðurstöður rannsóknarinnar benda til að mótefnið TTF-1 sé að litast í einhverjum hluta æxla utan lungna og skjaldkirtils sérstaklega í blöðruhálskirtilskrabbameini og eggjastokkakrabbameini. Vert er að athuga þetta enn frekar með því að auka fjölda sýna og auka þannig áreiðanleika þessara niðurstaðna.

Þakkir

Rannsóknarverkefnið er lokaverkefni til diplómaprófs í lífeindafræði við Læknadeild Háskóla Íslands og var unnið á Rannsóknarstofu í meinafræði á LSH.

Leiðbeinendur voru Jón Gunnlaugur Jónasson, Bjarni A. Agnarsson og Sigurrós Jónasdóttir og kann ég þeim mínar bestu þakkir fyrir góða leiðsögn, viðmót og aðstoð við verkefnið. Starfsfólk Rannsóknarstofu í meinafræði fær mínar bestu þakkir fyrir umburðarlyndi og gott samstarf. Að lokum langar mig að þakka fjölskyldu minni fyrir ómetanlegan stuðning.

Efnisyfirlit

Ágrip 3
Þakkir 5
Efnisyfirlit 6
Myndaskrá 8
Töfluskrá 8
Listi yfir skammstafanir 9
1 Inngangur 10
1.1 Greining krabbameina 10
1.1.1 Einkenni krabbameina 10
1.1.2 Rannsóknir krabbameina 10
1.2 Lungnakrabbamein 11
1.2.1 Smáfrumukrabbamein 12
1.2.2 Kirtilmyndandi krabbamein 12
1.2.3 Flöguþekjukrabbamein 13
1.2.4 Stórfrumukrabbamein 13
1.3 Nýrnakrabbamein 14
1.4 Ristilkrabbamein 14
1.5 Brjóstakrabbamein 15
1.5.1 Ífarandi gangakrabbamein 15
1.5.2 Ífarandi bleðlakrabbamein 16
1.6 Briskrabbamein 16
1.7 Magakrabbamein 17
1.8 Blöðruhálskirtilskrabbamein 17
1.9 Eggjastokkakrabbamein 18
1.9.1 Endometrioid æxli 18
1.9.2 Serous æxli 18
1.9.3 Mucinous æxli 19
1.10 Mótefni 19
1.10.1 TTF-1 19
1.10.2 CK7 20
1.10.3 CK20 20
2 Markmið 22
3 Efni og aðferðir 23
3.1 Úrtak rannsóknarþýðis og undirbúningur 23
3.2 Skurður og hreinsun. 23
3.3 Opnun bindiseta 23
3.4 Litun 24
3.4.1 Hematoxylin og Eosin litun 24
3.4.2 Mótefnalitun 24

3.5 Viðmiðunarsýni 25
3.6 Smásjárskoðun og mat á vefjasýnum 25
3.7 Úrvinnsla gagna 26
4 Niðurstöður 27
4.1 Almennar niðurstöður 27
4.2 Mótefnalitun með TTF-1 27
4.3 Mótefnalitun með CK7 29
4.4 Mótefnalitun með CK20 32
5 Umræða 35
6 Ályktanir 37
Heimildaskrá 38
Fylgiskjöl 42

Myndaskrá

Mynd 1. Tveggja þrepa fjölliðu aðferð (Envision™) 25
Mynd 2. Tjáning TTF-1 í blöðruhálskirtilskrabbameini (í 200x stækkun). 28
Mynd 3. Tjáning TTF-1 í mismunandi krabbameinum. 29
Mynd 4. Tjáning CK7 í mismunandi krabbameinum 31
Mynd 5. Tjáning CK7 í blöðruhálskirtli (í 40x stækkun).....31
Mynd 6. Tjáning CK20 í mismunandi krabbameinum. 33
Mynd 7. Tjáning TTF-1 í eggjastokkum (í 100x stækkun).....34
Mynd 8. Tjáning CK20 í eggjastokkum (í 100x stækkun).....34

Töfluskrá

Tafla 1. Upplýsingar um mótefnin sem notuð voru í rannsókninni.....24
Tafla 2. Fjöldi mismunandi æxla í rannsókninni og innbyrðis hlutfall þeirra. 27
Tafla 3. Tjáning TTF-1 í mismunandi krabbameinum. 28
Tafla 4. Tjáning CK7 í mismunandi krabbameinum.....30
Tafla 5. Tjáning CK20 í mismunandi krabbameinum.....32
Tafla 6. Tjáningamynstur CK7 og CK20 í mismunandi krabbameinum. 33

Listi yfir skammstafanir

Ad/SC	Adenosquamous carcinoma
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma
CEA	Carcinoembryonic antigen
CK	Cytokeratin
DAB	3,3´diaminobenzidine
EAC	Endometrioid adenocarcinoma
EMA	Epithelial membrane antigen
ER	Estrogen receptor
HER-2	Human epidermal growth factor receptor-2
HRP	Horseradish peroxidase
H&E	Hematoxylin & Eosin
IDC	Invasive ductal carcinoma
ILC	Invasive lobular carcinoma
kDa	Kilodalton
LCUD	Large cell undifferentiated carcinoma
LCNEC	Large cell neuroendocrine carcinoma
NCAM	Neural cell adhesion molecule, CD56
NOS	Not otherwise specified
NSCLC	Non small cell lung carcinoma
PR	Progesteron receptor
PRCC	Papillary renal cell carcinoma
PSA	Prostate specific antigen
RCC	Renal cell carcinoma
RCC Ma	Renal cell carcinoma marker
SCC	Squamous cell carcinoma
SCLC	Small cell lung carcinoma
TTF-1	Thyroid transcription factor
WHO	World health organization

1 Inngangur

1.1 Greining krabbameina

1.1.1 Einkenni krabbameina

Einkenni krabbameina geta verið mjög mismunandi eftir upprunastað. Mjög algengt er að einkenni krabbameina séu lítil í byrjun og fara þau oft ekki að koma fram fyrr en æxlið er farið að þrýsta á taugar eða fyrirferðaaukning er farin að gera vart við sig. Algeng einkenni meðal krabbameina eru t.d. slappleiki, lystarleysi, þyngdartap, þreyta, næturSviti og jafnvel langvarandi hiti. Í venjubundnu læknisefirliti eða þegar röntgenmynd er tekin geta æxli stundum uppgötvast fyrir tilviljun.

Reykingar eru orsakaþáttur margra krabbameina og eru ein aðal orsök lungnakrabbameins. Þær stuðla að ýmsum lungnasjúkdómum sem geta valdið hósta og getur reykingarhóstinn breyst ef um er að ræða lungnakrabbamein eða jafnvel leitt til þess að fólk fer að hósta blóði. Einnig getur lungnabólga verið einkenni lungnakrabbameins. Í nýrnakrabbameinum getur komið fram blóð í þvagi og jafnvel verkir og fyrirferðaaukning í kvið. Einnig getur blóðþrýstingshækkun verið einkenni nýrnakrabbameina. Breytt hægðamynstur, blóð í hægðum og kviðverkir geta komið fram í ristilkrabbameinum og einnig í magakrabbameinum. Gula getur verið einkenni gallsteina eða lifrarbólgu en einnig getur það verið einkenni briskrabbameins. Hnútur eða fyrirferð í brjósti er algengasta einkenni brjóstakrabbameina og blöðruhálkirtilskrabbamein uppgötvast yfirleitt ekki fyrr en æxlið er orðið stórt og stundum koma einkenni fyrst frá meinvörpum æxlisins. Einnig er algengt í krabbameinum í eggjastokkum að æxlið er orðið stórt við greiningu eða búið að dreifa sér um kviðarholið. Þyngdartilfinning og aukið umfang kviðar eru dæmi um einkenni eggjastokkakrabbameins (Jónasson o.fl., 2012)

1.1.2 Rannsóknir krabbameina

Við greiningu sjúklinga er yfirleitt byrjað á að taka af þeim sjúkrasögu og skoða þá læknisfræðilegri líkamsskoðun sem getur gefið fyrstu vísbendingu um æxlisvöxt. Framkvæma þarf ýmsar rannsóknir ef grunur er um krabbamein og fá það staðfest hvort það sé til staðar eða ekki. Þessar rannsóknir geta verið mjög mismunandi t.d. blóðrannsóknir, myndgreiningar, eða vefjasýnataka. Myndgreiningarrannsóknir eru mikið notaðar við leit að krabbameinum. Sem dæmi má nefna venjulegar röntgenrannsóknir, ómskoðanir, tölvusneiðmyndir, segulómanir eða ísótóparannsóknir auk þess sem holspeglanir hafa færst í aukana síðustu ár. Meinafræðingar byrja á að ákvarða að æxlisvöxtur sé til staðar á innsendu vefjasýni og eru þau tekin við ástungu með breiðri nál, í gegnum speglunartæki eða með skurðaðgerð. Greining krabbameins byggist svo að lokum á smásjárskoðun á frumusýnum eða vefjasýnum. Í frumusýnum er greining takmörkuð þar sem oftast er aðeins hægt að segja til um hvort krabbameinsfrumur séu til staðar eða ekki. Ef um krabbamein er að ræða er vefjasýni eða biti úr æxlisvef fenginn með skurðaðgerð sem getur sagt til um hvers kyns krabbamein er og jafnvel undirgerð þess. Með hefðbundinni H&E litun er hægt að komast býsna langt í greiningu æxlisins. Meginatriðin við vefjarannsókn er að meta æxlisgerð, þroskunargráðu æxlis (gráða), útbreiðslu æxlisins (stig) og hvort skurðbrúnir sýnisins innihaldi æxlisvöxt eða ekki. Vefjagerð æxlisins er metin út frá útliti og getur skipt mjög miklu máli varðandi horfur og meðferð sjúklinga. Krabbamein

geta einnig myndað meinvörp með því að dreifa sér á fjarlægan stað en eru samt sem áður yfirleitt sömu gerðar og upphafskrabbameinið (Jónasson o.fl., 2012). Stundum greinast vefjasýni frá meinvörpum t.d. í lifur, lungum eða beinum og þá er mikilvægt að vita hvaðan æxlisvefurinn er upprunninn (Chu o.fl., 2000).

Algengustu meinsemdirnar koma frá þekjuvef: lungna, brjósta, briskirtils, ristils, blöðruhálskirtils, eggjastokka og legslímhúðar. Þekjuvefskrabbamein frá þessum stöðum geta svo dreifst til nærliggjandi eitla og annarra líffæra (Chu o.fl., 2000). Þekjuvefur inniheldur frumur sem hylja yfirborð í líkamanum og skiptist hann í einfaldan þekjuvef eða lagskiptan þekjuvef sem samanstendur af tveimur eða fleiri frumulögum. Almennt hlutverk þessara frumna er annarsvegar vernd lagskiptu þekjunnar og hinsvegar þátttaka í flutningi efna yfir einfalda þekju (Sanderson o.fl., 1988). Frumur þekjuvefs skiptast svo í flögulaga, tengingslaga og stuðlalaga frumur (Troyanovsky o.fl., 1989).

Mótefnalitanir hafa í vaxandi mæli á unanförnum árum og áratugum komið til aðstoðar við nákvæmni vefjagreininga og einnig varðandi að tilgreina hugsanlegan upprunastað æxla þegar það er ekki ljóst, hvorki klínískt eða útfrá myndgreiningarrannsóknum fyrirfram. Mótefnalitun er notuð til að greina vaka í vefjasneiðum með því að nota ensímtengt mótefni (Dako, 2006). Greiningin getur hinsvegar oft verið flókin og jafnvel erfið þar sem ekkert eitt mótefni er bæði sértækt og næmt fyrir staðsetningunni (S. Y. Park o.fl., 2007).

Mótefnin cytokeratin 7 (CK7) og cytokeratin 20 (CK20) eru algeng mótefni sem notuð hafa verið á undanförnum árum við greiningar á æxlisvef og hafa til samans verið mjög gagnleg til að greina upphafsstað æxla. (S. Y. Park o.fl., 2007). Mótefnið thyroid transcription factor-1 (TTF-1) er hinsvegar nýrra mótefni og kom fram fyrir allnokkrum árum. Það hefur reynst gagnlegt og næmt til þess að greina æxli í lungum og skjaldkirtli. Þó hefur borið á því að mótefnið er ekki einskorðað við æxli með uppruna í lungum eða skjaldkirtli eins áður var talið og hefur verið að greinast í æxlum utan þessara líffæra (Matoso o.fl., 2010).

1.2 Lungnakrabbamein

Lungnakrabbamein er annað algengasta krabbamein á Íslandi hjá bæði körlum og konum og eru þau algengasta dánarorsök af völdum krabbameina. Á hverju ári greinast um 199 einstaklingar með krabbamein sem rekja má til tóbaksreykinga og þar af eru 140 einstaklingar sem greinast með lungnakrabbamein. Lungnakrabbamein er talið orsakast í um 80-90% tilfella af reykingum og áhætta þeirra sem reykja er margföld miðað við þá sem ekki reykja. Dánartíðni af völdum lungnakrabbameina er tvöfalt hærri en af nokkru öðru krabbameini og deyja um 130 Íslendingar árlega af völdum þeirra. Nýgengi lungnakrabbameina meðal íslenskra kvenna er mun hærra en í öðrum Norðurlöndum að Danmörku undanskilinni (Jónasson o.fl., 2012).

Flest lungnakrabbamein eru þekjuvefskrabbamein eða í yfir 99% tilfella og skiptast þau í fjóra meginflokka: smáfrumukrabbamein (20%), stórfrumukrabbamein (9%), flöguþekjukrabbamein (44% í körlum og 25% í konum) og kirtilmyndandi krabbamein (28% í körlum og 42% í konum). Hlutfall þessara flokka getur verið mismunandi eftir löndum (William D. Travis o.fl., 2004).

1.2.1 Smáfrumukrabbamein

Lungna smáfrumukrabbamein (Small cell lung carcinoma, SCLC) er talinn sem sérstakur flokkur af ýmsum ástæðum. SCLC er tiltölulega algeng tengund illkynja æxla og er mjög klínískt afgerandi miðað við aðrar tegundir. Líffræðilegir eiginleikar æxlisins og svörun þess við lyfjameðferð er það sem einkennir hana frá flestum krabbameinum sem eru ekki af smáfrumugerð og kallast non-small cell lung carcinoma (NSCLC) (W.D. Travis o.fl., 1999). Sjúkdómurinn skiptist í tvö stig, annarsvegar staðbundinn (limited disease) eða útbreiddan sjúkdóm (extensive disease) (Simon o.fl., 2007). Staðbundinn sjúkdómur er meðhöndlaður með lyfja- og geislameðferð og eru einungis um 20% sjúklinga sem ná bata og er miðgildi lifunar hjá þessum sjúklingum um 16-22 mánuðir. Sjúklingar með útbreiddan sjúkdóm eru fyrst og fremst meðhöndlaðir með lyfjameðferð þar sem svörun meðferðar er mikil í upphafi eða um 60-70% en miðgildi lifunar hjá þessum sjúklingum eru aðeins 10 mánuðir (Simon o.fl., 2007).

Útlit vefjarins í SCLC einkennist af smáum frumum og lögun þeirra er gjarnan hringlaga, sporöskjulaga eða spólulaga. Frumurnar innihalda lítið umfrymi og áberandi kjarna en kjarnakornið sést yfirleitt illa eða er jafnvel ekki til staðar (William D. Travis o.fl., 2004). Drep smáfrumukrabbameina eru gjarnan yfirgripsmikil og mynda þau oft einskonar hreiður eða bjálka.

Í mótefnalitun er smáfrumukrabbamein jákvætt fyrir NCAM (neural cell adhesion molecule, CD56), chromogranin og synaptophysin í flestum tilfellum og einnig er það jákvætt fyrir TTF-1 í um 90% tilfella (William D. Travis o.fl., 2004). Tjáning CK7 í smáfrumukrabbameini er í um 63% tilfella (Nagashio o.fl., 2010) en CK20 er ekki að greinast í þessum krabbameinum (Cheuk o.fl., 2001).

1.2.2 Kirtilmyndandi krabbamein

Kirtilmyndandi krabbamein (adenocarcinoma) í lungum geta verið mjög mismunandi að stærð og lögun, þau geta verið af einni undirtegund eða blönduð. Útlit meinsemdarinnar getur komið fram með ákveðnum mynstrum sem lýsir sér með bronchioloalveolar, totu- (papillary) eða þrúgumynstri (acinar) og einnig getur slímframleiðsla verið í solid kirtilkrabbameinum. Meinin geta innihaldið mismunandi vefjategundir, mynstur og þroskastig (William D. Travis o.fl., 2004). Signet ring, spólufrumu- og kirtilmyndandi krabbamein sem líkjast lifrar vef eru sjaldgæf mynstur (Colby o.fl., 1994).

Dreifing æxlisins er með sogæðum eða blóði (William D. Travis o.fl., 2004) og er um það bil einn fimmti af nýgreindum kirtilmyndandi krabbameinum með fjarlæg meinvörp. Algengustu meinvarps staðirnir eru í heila, beinum, lifur og nýrnahettum (Quint o.fl., 1996).

Meinafræði kirtilmyndandi krabbameina í lungum getur verið mismunandi og er algengasta tegundin svokallaðar blandaðar undirtegundir (adenocarcinomas mixed subtypes) (Terasaki o.fl., 2003). Mismunandi frumuafbrigði geta verið til staðar sem gjarnan breytast eftir því hvar þau eru. Óalgengt er að kirtilmyndandi krabbamein innihaldi aðeins eina algenga vefjategund miðað við blandað kirtilmyndandi krabbamein, sérstaklega í stórum æxlum. Öll þroskastig eru vel þekkt í þrúgu- og totumyndandi æxlum en aðeins miðlungs eða vel þroskaðan vef er að finna í bronchioloalveolar æxli. Þrúgumyndandi æxli einkennast af píplum og þrúgum sem eru samansettar af frumum sem hugsanlega framleiða slím og líkjast þekjuvefsfrumum berkju, þar á meðal Clara frumur (William D. Travis o.fl., 2004). Í mótefnalitunum gegnir TTF-1 mótefni mikilvægu hlutverki í greiningu á

kirtilmyndandi krabbameini í lungum og er talið jákvætt í u.þ.b. 75% tilfella. TTF-1 virkjar umritun surfactant próteina og seytiprótein Clara frumna í þekjufrumum lungnanna (Zamecnik o.fl., 2002). CK7 er yfirleitt jákvætt í flestum lungna kirtilkrabbameinum (Nagashio o.fl., 2010) en CK20 yfirleitt neikvætt nema í bronchioloalveolar carcinoma (BAC) sem inniheldur slím. Þar er CK20 yfirleitt jákvætt en TTF-1 neikvætt (William D. Travis o.fl., 2004)

1.2.3 Flöguþekjukrabbamein

Flöguþekjukrabbamein (squamous cell carcinoma, SCC) í lungum skiptast í undirflokka eftir stigi flöguþekju þroskans hverju sinni, æxlin geta verið vel þroskuð, miðlungs þroskuð og illa þroskuð (Colby o.fl., 1994). Það sem einkennir æxlisvef flöguþekju eru millifrumubrýr og/eða hornmyndun sem koma frá berkjuvef og einkenni frumnanna fer eftir á hvaða stigi vefurinn er greindur (William D. Travis o.fl., 2004). Í vel þroskuðu flöguþekjukrabbameini er yfirleitt auðvelt að finna millifrumubrýr og oft eru þau ríkuleg af keratíni en þessir eiginleikar eru ekki eins auðfundnir í miðlungs þroskuðum æxlum og á afmörkuðum svæðum í illa þroskuðum æxlum þar sem þau líkjast oft frekar stórfrumuæxli.

Flöguþekjukrabbamein hafa tilhneigingu til að vera miðsvæðis í vefnum og holumyndun er algeng eða í um einum þriðja tilfella og má finna í stórum sem smáum æxlum. Drep og blæðingar eru algengar í flöguþekjukrabbameini og ummerki um teppu er gjarnan til staðar í grunnvefnum og geta þau innihaldið atelectasis (lungnahrun), mucostasis (slímteppu), annars stigs sýkingu eða ígerð (Colby o.fl., 1994). Æxlisfrumur flöguþekjukrabbameina eru oft spólulaga og mynda flatar breiður með langan eða spólulaga kjarna. Þegar vefurinn er skoðaður eru æxlin yfirleitt hvít eða grá, oft með bandvefsmyndun, kolefnis pigment í miðjunni og stjörnulegan samdrátt í útjaðrinum. (William D. Travis o.fl., 2004). Cytokeratin með háan mólekúlþunga eins og 34βE12, CK5/6 og CK14 eru gjarnan jákvæð í flöguþekjukrabbameini (Scarpatetti o.fl., 2002). Mörg flöguþekjukrabbamein eru einnig að tjá keratin með lágan mólekúlþunga (35βH11) (William D. Travis o.fl., 2004) sem dæmi má nefna er tjáning CK7 í um 30% tilfella (Nagashio o.fl., 2010) en frekar fá flöguþekjukrabbamein eru jákvæð fyrir TTF-1 (Chhieng o.fl., 2001) og tjáning CK20 er lítil sem engin (Chu o.fl., 2000).

Flöguþekjukrabbamein hafa almennt tilhneigingu til að vera illvíg (William D. Travis o.fl., 2004) en mun sjaldgæfara er að finna þau sem meinvörp í fjarlægum líffærum í samanburði við kirtilkrabbamein eða aðrar vefjategundir í frumæxli lunga (Quint o.fl., 1996). Eftir skurðaðgerð er staðbundin endurkoma mun algengari í flöguþekjukrabbameini heldur en hjá öðrum frumutegundum (Cangemi o.fl., 1995).

1.2.4 Stórfrumukrabbamein

Stórfrumukrabbamein (large cell undifferentiated carcinoma, LCUD) eru æxli sem ekki eru af smáfrumugerð (non small cell lung carcinoma, NSCLC) og hefur ekki þá eiginleika sem smáfrumu-, kirtil- og flöguþekjukrabbamein hafa hvað varðar byggingu og frumugerð og oft er talað um að þau séu óþroskuð (undifferentiated). Stórfrumukrabbamein eru u.þ.b. 9% allra lungna krabbameina (W. D. Travis o.fl., 1995) og hafa mismunandi afbrigði. Sem dæmi má nefna large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) og basaloid carcinoma. Aðgreining þessara afbrigða byggist fyrst og fremst á útliti vefjarins en einnig með hjálp mótefnalitana (Sturm o.fl., 2001).

Í flestum tilfellum hafa frumur stórfrumukrabbameina enga sérstaka eiginleika en oft mynda þær frumuþyrpingar í stað þess að dreifa sér. Æxlin einkennast af breiðum (sheets) með stórar marghyrndar frumur sem innihalda blöðrulaga kjarna og áberandi kjarnakorn. (William D. Travis o.fl., 2004).

Dreifing stórfrumukrabbameina er svipuð öðrum æxlum sem ekki eru af smáfrumugerð í lungum en sérstakar undirgerðir dreifast með ólíkum hætti, viðbrögð þeirra við meðferð eru mismunandi og batahorfur oft góðar (William D. Travis o.fl., 2004). Meinvörp eiga sér oftast stað í eitlum miðmætis (mediastinal nodes) (Stenbygaard o.fl., 1999). Mismunandi afbrigði stórfrumukrabbameina tjá ólíka mótefnavaka í mótefnalitun. Chromogranin, synaptophysin og CD56 eru jákvæð í LCNEC og TTF-1 í 50% tilfella. Neuroendocrine mótefni eru yfirleitt neikvæð í basaloid carcinoma en CK 1, 5, 10 og 14 eru jákvæð (William D. Travis o.fl., 2004). CK7 er jákvætt í LCNEC í 91% tilfella (Nagashio o.fl., 2010).

1.3 Nýrnakrabbamein

Nýrnakrabbamein eru rúmlega 3% allra illkynja æxla hér á landi. Meðalaldur sjúklinga við greiningu er 65 ár og eru tvöfalt fleiri karlmenn sem greinast með nýrnakrabbamein en konur á Íslandi. Nýrnafrumukrabbamein (Renal cell carcinoma, RCC) er algengasta illkynja æxlisgerðin (Jónasson o.fl., 2012) og kemur frá þekjufrumum (Eble o.fl., 2004). Tærfrumugerð nýrnafrumukrabbameins (Clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) er um 70% af RCC og lang algengasta undirgerðin (Prasad o.fl., 2006). Hún einnkennist af frumum með tært umfrymi sem er oftast fullt af lípíðum og glýkógeni. Kjarnarnir eru gjarnan hringlaga og jafnir (uniform) með smáum kornum (granular). Vimentin og cytokeratin með lágan mólekúl þunga eru gjarnan jákvæð í nýrnafrumukrabbameini af tærfrumugerð og má þar helst nefna CK8, CK18, CK19, AE1 og CAM 5,2 (Eble o.fl., 2004). Einnig hefur tjáning merkigensins Renal cell carcinoma (RCC Ma) verið að greinast í um 80-93% í frumæxlum renal cell carcinomas og í 67-84% í RCC meinvörpum (McGregor o.fl., 2001). Papillary renal cell carcinoma (PRCC) er næst algengasta undirgerðin í RCC (Prasad o.fl., 2006) og einkennist af totu- (papillae) og píplumyndum (tubules) illkynja þekjufruma. Æxlistoturnar innihalda fínlega trefja- og æðakjarna (fibrovascular core) og oft eru til staðar þyrpingar af froðukenndum átfrumum. Tvö afbrigði eru til af PRCC og skiptast þær í gerð I og II. Æxli af gerð I lýsa sér með smáum frumum með lítið umfrymi sem hylja toturnar en í gerð II eru frumur sem eru með eosinophilic umfrymi og gervilagskiptan (pseudostratified) kjarna. Tjáning CK7 er algengari í gerð I en gerð II (Eble o.fl., 2004).

Í nýrnakrabbameinum er CK7 tjáð í um 11% tilfella en tjáning CK20 og TTF-1 er lítil sem engin (Chu o.fl., 2000; Moll o.fl., 1992; Wieczorek o.fl., 2002).

1.4 Ristilkrabbamein

Á Íslandi eru ristilkrabbamein um 7% allra illkynja æxla þar sem meðalaldur sjúklinga er um 70 ár við greiningu og er þetta þriðja algengasta dánarosökin af völdum krabbameina hér á landi (Jónasson o.fl., 2012). Colorectal adenocarcinoma er illkynja þekjuvefskrabbamein í ristli og endaþarmi og hefur mismunandi birtingarform. Það einkennist af ífarandi æxlisvexti sem nær í gegnum vöðvalag

slímhúðar og niður í undirslímu eða dýpra. Í vel og miðlungs þroskuðu kirtilmyndandi krabbameini eru þekjufrumurnar yfirleitt stórar og háar. Mucinous adenocarcinoma er afbrigði sem samanstendur af utanfrumuslími sem inniheldur illkynja þekjufrumur og flokkast sem slík ef það inniheldur meira en 50% slím (Hamilton o.fl., 2000). Signet-ring cell carcinoma einkennist af innanfrumuslími sem ýtir kjarnanum út í jaðarinn (Sasaki o.fl., 1998). Adenosquamous carcinoma (Ad/SC) sýnir gjarnan einkenni bæði flöguþekjukrabbameins og kirtilmyndandi krabbameins sem annaðhvort eru aðskilin eða blanda af hvoru tveggja. Óþroskuð krabbamein (undifferentiated carcinoma) eru illkynja æxli sem skortir kirtilmyndun og lögun sem gefa til kynna ákveðna þroskun (Mills o.fl., 2004). Þekjuvefskrabbamein sem innihalda spólufrumur (spindle cells) eru oft kölluð spólufrumukrabbamein (spindle cell carcinoma eða sarcomatoid carcinoma) og eru oft jákvæð fyrir cytokeratinum (Hamilton o.fl., 2000). Mótefnin CK20 og CK7 hafa oft verið notaðir til að greina ristilkrabbamein frá öðrum kirtlakrabbameinum í öðrum líffærum. Meira en 90% kirtilkrabbameina í ristli eru CK7 neikvæðir og CK20 jákvæðir sem hefur reynst mjög gagnlegt við greiningar á meinvörpum og til að vita hvaðan æxlisvefurinn er upprunninn (Chu o.fl., 2000). Hinsvegar er þetta ekki algilt þar sem að CK7 getur greinst jákvætt í ristilkrabbameini sérstaklega í æxlum með eitlameinvörp. Einnig getur tjáning CK20 verið mismunandi eftir þroskunargráðu (histological grade) og staðsetningu æxlisins og er hún gjarnan algengari í æxlum sem eru af lægri gráðu (low grade) (Bayrak o.fl., 2011). TTF-1 hefur ekki verið að greinast í ristilkrabbameinum nema þá í mjög litlu magni eða í um 2,5% tilfella (Bejarano o.fl., 1996; Holzinger o.fl., 1996; Matoso o.fl., 2010).

1.5 Brjóstakrabbamein

Á Íslandi eru brjóstakrabbamein tæplega 30% af öllum krabbameinum hjá konum og hefur nýgengi þeirra aukist á síðustu áratugum (Jónasson o.fl., 2012). Samkvæmt alþjóðaheilbrigðisstofnuninni (WHO) eru brjóstakrabbamein flokkuð eftir ákveðnum vefjagerðum (Tavassoli o.fl., 2003), einkum í tvo meginflokka sem eru gangakrabbamein (ductal carcinoma) og bleðlakrabbamein (lobular carcinoma).

1.5.1 Ífarandi gangakrabbamein

Ífarandi krabbamein af gangatoga (invasive ductal carcinoma, IDC; not otherwise specified, NOS) eru misleit æxli. Ductal carcinoma NOS er algengasta gerðin sem nemur allt að 75% allra greindra ífarandi brjóstakrabbameina og flest þessara æxla koma úr mjólkurkirtlum þekjuvefs. Þau eru sjaldgæf hjá konum undir 40 ára aldri en þau sem greinast í ungum konum eru yfirleitt svipuð í útliti og hjá þeim eldri. Útlit æxlanna getur verið mjög breytilegt eftir tilfellum. Æxlisfrumum er hægt að raða niður eftir myndun þeirra í strengi, þyrpingar og bjálka (trabeculae) á meðan önnur æxli einkennast aðallega af þéttum eða fjölkjarna ífarandi mynstrum. Krabbameinsfrumurnar hafa einnig breytilegt útlit með ríkulegt umfrymi og kjarnar þeirra geta verið reglulegir og áþekkir eða fjölbreytilegir með áberandi og oft mörg kjarnakorn. Ductal carcinoma in situ er einnig til staðar í allt að 80% tilfella, en líta má á það sem forstigskrabbamein því þar er ekki um að ræða æxlisvef sem tök hefur á að mynda meinvörp (Tavassoli o.fl., 2003). Í mótefnalitun eru ífarandi gangakrabbamein jákvæð fyrir estrogen- (ER) og

progesteron hormónaviðtökum (PR) í tæpum 70% tilfella og Her-2 (Human epidermal growth factor receptor-2) í um 26% tilfella (Zhao o.fl., 2004).

1.5.2 Ífarandi bleðlakrabbamein

Ífarandi bleðlakrabbamein (Invasive lobular carcinoma, ILC) er önnur allgengasta vefjategundin og er talin vera 5-15% allra ífarandi brjóstakrabbameina (Winchester Md o.fl., 1998). Dæmigert útlit ífarandi bleðalkrabbameina einkennist af fjölgun smárra fruma, sem eru stakar vegna skorts á samloðun. Frumurnar dreifast innan um trefjar bandvefs eða raða sér saman í einfaldar línulegar raðir sem ráðast svo inn í uppistöðuvefinn. Æxlisfrumurnar hafa kringlóttan eða egglaga kjarna og lítið umfrymi með einstaka “innanfrymis“ holrúm (Tavassoli o.fl., 2003). Um 78% bleðlakrabbameina eru jákvæð fyrir ER og um 67% eru jákvæð fyrir PR (Zhao o.fl., 2004).

CK7 er yfirleitt tjáð í bæði ífarandi bleðlakrabbameini og ífarandi gangakrabbameini en ekki CK20 og TTF-1(Chu o.fl., 2000; Matoso o.fl., 2010).

1.6 Briskrabbamein

Hér á landi eru krabbamein í brisi um 2% allra krabbameina og er meðalaldur við greiningu um 69 ár. Kirtilkrabbamein (adenocarcinoma) er langalgengasta vefjategundin og eru batahorfur yfirleitt slæmar (Jónasson o.fl., 2012). Flest ductal adenocarcinoma eru vel til miðlungs þroskuð og einkennast af vel þroskaðri kirtilmyndun og breytileiki á þroskunargráðu innan sama æxlis eru algeng. Formgerð vel þroskaðra krabbameina samanstanda af meðalstórum illkynja kirtlum (glands) og stórum ”duct-like structures” (sem líkjast göngum eða rásum). Illkynja kirtlar sem innihalda slím einkennast af því að vera ófullgerðir eða jafnvel rofnir og eru frumur þess gjarnan stuðlalaga með eosinophilic umfrymi sem stundum getur verið fölt eða jafnvel alveg glært. Kjarninn getur verið stór og egglaga eða kringlóttur og skýr kjarnakorn eru algeng sem ekki sést í eðlilegum frumum. Miðlungs þroskuð krabbamein sýna aðallega blöndu af meðalstórum ”duct-like structures” og eru ófullgerðir kirtlar algengir. Meiri breytileiki er í kjarnastærð og gerð litnis miðað við vel þroskuð krabbamein. Stundum er mikið af tærum frumum (clear cells) og slímframleiðsla er oft aukin. Illa þroskuð ductal carcinoma eru sjaldgæf og samanstanda af þéttum, litlum og óreglulegum kirtlum. Illkynja frumurnar hafa greinilegan margbreytileika og litla sem enga slímmyndun (Hamilton o.fl., 2000). Mótefnalitun fyrir ductal adenocarcinoma tjáir sömu cytokeratina og eðlilegar þekjuvefs rásir (ducts) sem eru CK 7, 8, 18 og 19. Tjáning CK20 getur hinsvegar verið mjög mismunandi eftir rannsóknum því samkvæmt (Hamilton o.fl., 2000) er það yfirleitt að greinast neikvætt en samkvæmt (Chu o.fl., 2000) er það að greinast í um 62% tilfella. Flest ductal adenocarcinoma eru jákvæð fyrir MUC1, MUC3 og MUC5/6 (Terada o.fl., 1996). Mótefnið Carcinoembryonic antigen (CEA) er oft notað til að greina á milli ductal carcinoma og krabbameina sem eru ekki af ductal gerð í brisi (Batge o.fl., 1986). Tjáning TTF-1 hefur ekki verið að greinast í briskrabbameinum (Matoso o.fl., 2010).

1.7 Magakrabbamein

Á Íslandi eru magakrabbamein um 2-3% allra krabbameina og er meðalaldur við greiningu um 71 ár (Jónasson o.fl., 2012). Krabbamein í maga eru illkynja æxli í slímhúð magans og er orsök þess margþætt. Langvarandi magabólgur og einnig sýking af völdum bakteríunnar Helicobacter pylori er oft orsakavaldurinn (Hamilton o.fl., 2000). Kirtilmyndandi krabbamein er lang algengasta vefjategundin í magakrabbameinum eða um 90% (Lastraioli o.fl., 2012) og einkennast þau af miklum breytileika. Kirtilkrabbamein er gjarnan kirtilmyndandi meinsemd sem samanstendur af píplu- (tubular), þrúgu- (acinar) eða totumyndun (papillary) en einnig geta þau innihaldið blöndu af einangruðum frumum sem hafa mjög breytilegt útlit. Tubular adenocarcinoma innihalda áberandi útþandar og greinóttar píplur og stakar æxlisfumur eru annaðhvort með hringlaga, teningslaga eða flatt útlit. Totumyndandi kirtilkrabbamein (papillary adenocarcinoma) eru vel þroskuð og útbungandi inn í holrúmi magans með blómkálsútliti (exophytic) sem einkennast af sívölum eða tengingslaga frumum sem umlykja ílanga fingurlaga ganga. Útlit mucinous adenocarcinomas samanstendur af slímseytandi þekjuvef sem umlykur kirtla eða óreglulegum frumuþyrpingum sem fljóta í slími. Signet ring er undirgerð magakrabbameina sem hefur afgerandi útlit og einkennist gjarnan af kjörnum sem eru við jaðar frumuhimnunar og mynda svokallað signet ring útlit. Flöguþekju- og óþroskuð krabbamein eru sjaldgæfar vefjategundir í magakrabbameinum (Hamilton o.fl., 2000). Tjáning CK7 greinist í magakrabbameinum í um 72% tilfella og CK20 í um 41% tilfella (So Yeon Park o.fl., 2002). TTF-1 hefur sýnt litla sem enga tjáningu í magakrabbameinum eða í minna en 1% tilfella (Matoso o.fl., 2010).

1.8 Blöðruhálskirtilskrabbamein

Krabbamein í blöðruhálskirtli er um þriðjungur allra krabbameina og algengustu krabbameinin hjá karlmönnum á Íslandi (Jónasson o.fl., 2012). Það er sjötta algengasta krabbamein í öllum heiminum og nýgengi í Bandaríkunum, Ástralíu og í Skandinavískum löndum er mjög hátt sem líklega má rekja til aukinnar mælinga á PSA í blóði. Kirtilmyndandi blöðruhálskirtilskrabbamein innihalda yfirleitt kirtla sem eru mun þéttskipaðari heldur en birtist í góðkynja vef þar sem kirtlarnir vaxa annaðhvort sem afmarkaðir hnúðar innan æxlisins eða jafn dreifðir á yfirborði svæðisins. Óþroskuð blöðruhálskirtilskrabbamein einkennist af breiðum (solid sheets), frumustrengjum (cords of cells) eða einangruðum stökum frumum. Kjarnar í blöðruhálskirtilskrabbameini geta verið mjög mismunandi en stærð þeirra fer oft eftir þroskastigi æxlisins. Algengt er að sjá stækkaða kjarna með áberandi kjarnakorn (Eble o.fl., 2004). Prostate specific antigen (PSA) er glýkóprótein með ensímvirkni og er framleitt af þekjufrumum (Cho o.fl., 1997) sem umlykja rásir blöðruhálskirtilsins og hefur reynst gagnlegt mótefni til þess að greina þroskaðan vef í blöðruhálskirtli. PSA er staðbundið í umfryminu í eðlilegum vef kirtilsins en er ekki tjáð af basal frumum, kirtilfrumum sáðrásar né frumum þvagfæraþekju (Eble o.fl., 2004). Komið hefur í ljós að cytokeratin með háan mólekúlmassa (Cytokeratin 903) tjá aðeins basal frumur í eðlilegum og stækkuðum (hyperplastic) þekjuvef í blöðruhálskirtli. Hinsvegar hefur mótefnið Cytokeratin 902 verið að tjá keratin prótein sem eru til staðar í eðlilegum og stækkuðum columnar (seyti-) þekjufrumum og í krabbameinsfrumum (Brawer o.fl., 1985). Í kirtilmyndandi krabbameini blöðruhálskirtils hefur CK7 verið að greinast í um 12% tilfella og

CK20 í um 24% tilfella (Genega o.fl., 2000). Tjáning TTF-1 er lítil sem engin í blöðruhálskirtilskrabbameinum eða í 1,2% tilfella eða minna (Bejarano o.fl., 1996; Matoso o.fl., 2010).

1.9 Eggjastokkakrabbamein

Eggjastokkakrabbamein eru frekar sjaldgæf hjá konum undir 50 ára aldri og eru þau 2,3% allra illkynja æxla hér á landi (Jónasson o.fl., 2012).

Algengustu æxlin í eggjastokkum eru yfirborðs þekjuvefsæxli í uppistöðuvef (surface epithelial-stromal tumours). Þau eru samsett úr einni eða fleiri aðgreindum tegundum af þekjuvef og er líffræðileg hegðun þeirra breytileg eftir tegund. Þrjár megin tegundirnar eru eftirfarandi:

1.9.1 Endometrioid æxli

Endometrioid æxli geta verið bæði illkynja og góðkynja meinsemd (Tavassoli o.fl., 2003). Þau einkennast af kirtlum og totum og er legbolsútlit, flöguþekju þroskun og legslímuflakk algengt að sjá í útliti æxlisins (Soslow, 2008). Þau skiptast í margar undirtegundir en algengasta tegundin er endometrioid adenocarcinoma (EAC) sem er illkynja þekjuvefs æxli (Tavassoli o.fl., 2003) og er um 16-25% af öllum þekjuvefsæxlum í eggjastokkum (Storey o.fl., 2008). Vel þroskaður vefur getur haft hringlaga, sporöskjulaga eða pípulaga kirtla sem eru þaktir lagskiptum þekjuvef sem inniheldur ekki slím. Flöguþekju þroskun kemur fram í 30-50% tilfella (Tavassoli o.fl., 2003) sem getur haft bæði góðkynja og illkynja útlit. Einnig getur EAC haft villoglandular mynstur sem gjarnan sést í þekjuvefskrabbameinum legslímu (Scully o.fl., 1999). Endometrioid krabbamein eru jákvæð fyrir vimentin, cytokeratin, epithelial membrane antigen (EMA), estrogen og progesterone viðtökum í mótefnalitunum (Tavassoli o.fl., 2003).

Non-mucinous æxli eru jákvæð fyrir CK20 í um 25% tilfella en CK7 í um 80% tilfella (Tot, 2002). Tjáning TTF-1 í eggjastokkaæxlum hefur verið að greinast í 13% tilfella og mest í endometrioid æxlum eða í u.þ.b 64% jákvæðra sýna (Fujiwara o.fl., 2010).

1.9.2 Serous æxli

Eggjastokkaæxli einkennast af betur þroskuðum (differentiated) formum (forms) sem fara eftir frumu gerðum. Serous adenocarcinoma eru ífarandi eggjastokka æxli og geta þau verið allt frá vel þroskuðum æxlum eins og í þekjuvef eggjaleiðara til illa þroskaðra æxla sem innihalda anaplastic (villivaxtar-) þekjufrumur með mjög afbrigðilegum (atypia) kjarna. Bygging æxlanna getur verið mjög breytileg t.d. geta þau verði með kirtil-, totu- eða solid myndun. Serous borderline tumour er eggjastokka æxli sem sýnir afbrigðilega fjölgun frumna í þekjuvef þar sem frumurnar eru stærri en sjást í samskonar góðkynja æxli en án skaðlegrar innrásar í uppistöðuvef. Þær frumur sem eru í mikilli fjölgun geta verið mjög breytilegar eða allt frá því að vera litlar með oflituðum kjörnum til stærri frumna með eosinophilic umfrymi. Benign serous tumours eru góðkynja æxli sem samanstanda af þekjuvef sem líkist þekjuvef eggjaleiðara. Það sem einkennir útlit æxlisins er að blöðrurnar eða cysts eru flattar út sem getur gefið til kynna að um sé að ræða góðkynja serous æxli (Tavassoli o.fl., 2003).

1.9.3 Mucinous æxli

Mucinous æxli skiptast í undirflokka og innihalda flestar þekjufrumur æxlanna slím. Frumur mucinous æxla líkjast helst leghálsslímu, maga pylorus eða þarma. Meinvörp ýmissa mucinous krabbameina geta komið klínískt fram eins og frumæxli mucinous æxla eggjastokka og eiga flest annarra slíkra æxla upptök sín t.d. í ristli, botnlanga, brisi eða maga.

Mucinous adenocarcinoma er illkynja undirflokkur mucinous æxla. Vel þroskuð svæði líkjast gjarnan þarma- eða innanleghálsþekjuvef (endocervical endothelium). Þá er um ífarandi æxlisvöxt að ræða.

Mucinous borderline æxli samanstendur einnig af tveimur æxlisfrumugerðum sem líkjast þarma- og innanleghálsfrumum. Frumur æxlanna eru í samanburði við góðkynja æxli og eru slík æxli gjarnan með stærri kjarna, óreglulega uppröðun kjarna innan frumna, fjölgun kjarnadeilinga eða upphleðslu fruma. Hinsvegar sést ekki ífarandi vöxtur í stroma og það greinir þessa tegund frá illkynja mucinous carcinoma.

Góðkynja mucinous æxli innihalda þekjuvef sem líkist gjarnan innanlegháls- eða iðraþekjuvef (gastrointestinal epithelium). Iðraþekjuvefur inniheldur nánast alltaf bikarfrumur og oft taugakirtilfrumur. Góðkynja slímæxli samanstanda af cystadenoma (kirtilæxli með fleiri eða færri blöðrum), adenofibroma (æxli gert úr kirtlum og bandvef) og cystadenofibroma (belg- og kirtiltrefjaæxli). (Tavassoli o.fl., 2003).

Í mucinous æxlum er tjáning CK20 í um 73% tilfella en tjáning CK7 í um 95% tilfella (Vang o.fl., 2006).

1.10 Mótefni

1.10.1 TTF-1

Thyroid transcription factor-1 er stjórnunarhneppi (homeodomain) eða prótein sem inniheldur umritunarþátt og er hluti af Nkx2 gena fjölskyldunni (Nakamura o.fl., 2002; Sheppard, 2000). Próteinið gegnir mikilvægu hlutverki í þroska og vexti frumunnar (Nakamura o.fl., 2002). Þessi umritunarþáttur er tjáður í alveolar týpu II frumum í lungum, þekjufrumum skjaldkirtils og í ákveðnum hlutum heilans (Sheppard, 2000). TTF-1 virkjar umritun ákveðinna viðtaka í follicular frumum og gen sem tengjast efnaskiptum kalsíums í C frumum skjaldkirtils (Nakamura o.fl., 2002). Talið er að TTF-1 stjórni formþroskun þekjuvefs í lungum (Sheppard, 2000) og genatjáningu sérstakra Surfactant próteina (A, B og C) og seytipróteini Clara fruma (Nakamura o.fl., 2002). Í heilbrigðum vef er TTF-1 ekki tjáð í heiladingli, blöðruhálskirtli, eistum, nýrnahettum, húð, brjóstum, nýra, lifur, brisi, smáþörmum og maga.

Þetta kjarnaprótein (Bishop o.fl., 2010) er helst tjáð í æxlum lungna og skjaldkirtils (Holzinger o.fl., 1996) en í þeim tegundum þekjuvefskrabbameina í lungum hefur TTF-1 aðallega sýnt fram á tjáningu í frumæxli kirtilmyndandi krabbameina, stórfrumukrabbameina og smáfrumukrabbameina (Fabbro o.fl., 1996; Kaufmann o.fl., 2000). Hins vegar hefur minni tjáning TTF-1 verið að greinast í stórfrumukrabbameinum heldur en í smáfrumu- og kirtilmyndandi krabbameinum eða í um 25-47% tilfella (Kaufmann o.fl., 2000; Khoor o.fl., 1999; Matoso o.fl., 2010). Flestar rannsóknir benda til að lítil

tjáning sé í flöguþekjukrabbameini fyrir mótefninu (Bishop o.fl., 2010; Khoor o.fl., 1999) en í einstaka tilfellum hefur það verið að greinast í litlu magni eða í u.þ.b. 14% tilfella (Haque o.fl., 2002). Mótefnið hefur verið að greinast neikvætt í nýrnakrabbameinum, fleiðrukrabbameinum og kirtilkrabbameinum í ristli, brjóstum, blöðruhálskirtli og brisi í flestum tilfellum (Bejarano o.fl., 1996; Bishop o.fl., 2010; Holzinger o.fl., 1996; Matoso o.fl., 2010; Wieczorek o.fl., 2002). Við notkun á fjölstofna TTF-1 mótefni greindist aðeins eitt af 66 magakrabbameina og eitt af átta legbolskrabbameina jákvæð (Bejarano o.fl., 1996). Tjáning TTF-1 í eggjastokkakrabbameini hefur hinsvegar verið að greinast í um 13% tilfella og þá mest í endometrioid æxlum (Fujiwara o.fl., 2010). Rannsóknir benda til að mótefnið sé yfirleitt neikvætt ef um er að ræða solid kirtilkrabbamein með slímmyndun í frumæxli lunga (Reis-Filho o.fl., 2000). Mótefnið er notað á formalín festan vef sem er innsteyptur í paraffín (Bishop o.fl., 2010).

1.10.2 CK7

Cytokeratin samanstanda af u.þ.b. 20 mismunandi fjölpeptíðum í manninum og mynda svokallaða intermediate filaments fjölskyldu. Þau skiptast í tvær megingerðir, súra (gerð I) og hlutlausa-basíska (gerð II) og mólekúlþungi þeirra er frá 40 til 68 kDa (lágur mólekúlþungi). CK7 er 54 kDa prótein sem tilheyrir hlutlausu-basísku gerðinni. Tjáning cytokeratina er yfirleitt bundin við þekjuvef og æxlum þeirra (Moll o.fl., 1982). Tjáning CK7 í þekjuvefskrabbameinum er mjög fjölbreytileg og hefur reynst gagnleg við mismunandi greiningar á þekjuvefskrabbameinum sem eru af þekjuvefs uppruna t.d. kirtilmyndandi krabbameinum í lungum, brjóstum, kynfærum kvenna, brisi, transitional þekjuvefskrabbameinum (þvagfæraþekju) (Ramaekers o.fl., 1990) og einnig chromophobe renal cell carcinoma (Leroy o.fl., 2000). Mótefnið er hægt að nota á vef sem er festur í formalíni eða Bouin´s vökva og einnig er hægt að nota það á frystar sneiðar (van NiekerkJap o.fl., 1991) og frumu strok (Baars o.fl., 1994).

Mótefnið er ávallt jákvætt í stórum hluta af heilbrigðum þekjuvef, einföldum, lagskiptum eða transitional. Þar á meðal eru: lungnablöðrur, þekjuvefur berkju og berkjunga, rásir blöðruhálskirtils, næriþekja fylgju, legslímhúð, innanleghals kirtlar og luminal frumur eggjaleiðara og legslímu, berkju-, svita- og munnvatnskirtlar, fjærpíplur og safngangar nýrans, gallrás, brispípa, og öll frumulög þvagfæraþekju (van NiekerkJap o.fl., 1991). Auk þess hefur CK7 verið að greinast jákvætt í yfirborði þekjuvefs í eggjastokkum (van NiekerkBoerman o.fl., 1991) og myoepithelial frumum. Í columnar (stuðlalaga) og grunnfrumum blöðruhálskirtils eru frumurnar að greinast bæði jákvæðar og neikvæðar fyrir mótefninu (van NiekerkJap o.fl., 1991). Á sneiðum sem gerðar eru með frystiskurði eru þekjuvefsnet eista, þekjuvefur eistnalyppa og yfirborð þekjuvefs í maga og skeifugörn jákvæð fyrir mótefninu (Ramaekers o.fl., 1990).

1.10.3 CK20

Cytokeratin 20 (CK 20) tilheyrir einnig intermediate filament próteinum eins og CK7. Mólekúlþungi þess er 46 kDa (lágur mólekúlþungi) og tilheyrir það súrum hópi fjölskyldunnar en er minna súrt en önnur cytokeratin af gerð I.

CK20 er næstum alltaf tjáð í Merkel frumum (þreififrumum), þvagfæraþekju og þekjuvef maga og þarma bæði í afbrigðilegum og heilbrigðum vef. Mótefnið er tjáð í bæði frumæxli og samsvarandi meinvörpum þekjuvefskrabbameina sem eru á vel afmörkuðu svæði. Jákvæðni CK20 kemur fram í miklum meirihluta í kirtilkrabbameinum í ristli, mucinous æxlum í eggjastokkum, transitionalfrumu krabbameinum og Merkel frumu krabbameini. Einnig eru kirtilmyndandi krabbamein í maga að greinast jákvæð í um helmingi tilfella, æxli upprunnin í gallgöngum í 75% tilfella og briskrabbamein í u.þ.b. 40% tilfella. Kirtilkrabbamein í lungum og brjóstum og flöguþekjukrabbamein eru jákvæð í minna en 2% tilfella en kirtilmyndandi krabbamein í eggjastokkum (non-mucinous) og legslímhúð, nýrnafrumu- og smáfrumukrabbamein sýna litla sem enga svörun við mótefninu (Moll o.fl., 1992). Mótefnið er hægt að nota á formalin festan vef (Harnden o.fl., 1999) en ekki á frystiskurðasneiðar eða frumustrok (Moll o.fl., 1992).

2 Markmið

Markmið þessarar rannsóknar er að athuga litunarmynstur TTF-1, CK7 og CK20 í hinum ýmsu æxlum og auka þannig skilning á hve mikill breytileiki er í litunarniðurstöðum. Lituð eru fjöldi æxla frá mörgum mismunandi stöðum í líkamanum með mótefnunum (TTF-1, CK7 og CK20) auk HE litunar sem er notuð til hjálpar við mat á litunum. Þetta verkefni getur aukið öryggi meinafræðinga við greiningu og mat á æxlum og einnig hjálpað til við mat á meinvörpum m.t.t. líklegs upphafsstaðs æxlis.

Mikilvægt er að greining geti verið sem nákvæmust og best svo sjúklingar geti fengið rétta meðhöndlun. Öll sýnin eru metin í samvinnu við tvo meinafræðinga.

3 Efni og aðferðir

3.1 Úrtak rannsóknarþýðis og undirbúningur

Í upphafi rannsóknar var leitað í gagnabanka Rannsóknarstofu í meinafræði á Landspítalanum með aðstoð SNOMED númerakerfisins sem notað er á stofnuninni.

Ekki er unnið með nafngreinda einstaklinga í rannsókninni og litið á verkefnið sem þróunarverkefni og því ekki talið nauðsynlegt að sækja um leyfi til Vísindasiðanefndar eða Persónuverndar.

Alls voru 61 krabbameinssýni valin frá árunum 2007-2012 úr átta mismunandi líffærum: nýra, ristli, brjósti, brisi, maga, blöðruhálskirtli, fjórar mismunandi vefjategundir úr lunga (smáfrumukrabbamein, kirtilmyndandi krabbamein, flöguþekjukrabbamein og stórfrumukrabbamein) og þrjár mismunandi vefjategundir úr eggjastokkum (endometrioid, serous og mucinous æxli).

Fundin voru til öll smásjárgler frá fyrri greiningum og þau skoðuð í smásjá (af Jóni Gunnlaugi og Bjarney) og valdir þeir paraffin-innsteyptu vefjabitar sem álitnir voru heppilegir fyrir rannsóknina, þ.e. einn úr hverju æxli (reyndar tveir kubbar frá einu æxlinu þar sem kom fram tvenns konar æxlisgerð innan æxlisins). Í flestum tilfellum var aðeins einn kubbur valinn frá hverjum sjúklingi.

Merkt voru sex smásjárgler fyrir hvert númer: eitt venjulegt smásjárgler fyrir Hematoxylin og Eosin (H&E) litun og 5 starfrostgler sem notuð voru fyrir mótefnalitanir á TTF-1, CK7, CK20 og tvö voru höfð til vara.

3.2 Skurður og hreinsun.

Áður en skurður hófst voru vefjakubbarnir kældir á sérstakri kæliplötu sem auðveldar skurðinn og gerir hann mögulegan. Skornar voru 6 vefjasneiðar úr hverjum vefjakubbi í Leica RM2255 microtome skurðarvél (Leica, Nussloch, Germany), fimm vefjasneiðar 3,0 µm að þykkt sem voru settar á starfrostgler og ein 2,0 µm að þykkt á venjulegt smásjárgler. Starfrostglerin voru höfð í þurrki yfir nótt við u.þ.b. 25°C og að því loknu voru þau sett inn í hitaskáp í 1 klst. en venjulegu smásjárglerin voru höfð í 18 mín við 60°C. Sneiðarnar fyrir mótefnalitanirnar eru látnar ganga niður í xylene í tvisvar sinnum 5 mínútur sem hreinsar paraffínið úr sneiðunum og síðan settar í þurrk í 2 mín. Að því loknu fóru þær í absolute alkahól í tvistvar sinnum 5 mínútur og að lokum skolaðar í vatni. Sneiðarnar fyrir H&E litunina voru hafðar í 5 mín. í xylene, tvær mín. í þurrki og þrjár mínútur í absolute alkóhóli. Allur skurður var framkvæmdur af Sigurrós Jónasdóttur lífeindafræðingi.

3.3 Opnun bindiseta

Opnun bindiseta er aðferð sem notuð er til þess að brjóta niður vetnistengi sem myndast við formalin festingu og geta sumir þessara festa hamlað virkni mótefnanna (Carson o.fl., 2009). Eftir skolun í vatni voru vefjasýnin sett í Target Retrieval solution, high ph (Dako, Glostrup, Denmark) sem er virkt efni og inniheldur Tris/EDTA, pH9 (Dako). Þetta er hitað í vatnsbaði samkvæmt stöðluðum aðferðum Rannsóknarstofu í meinafræði. Sjá nánar fylgiskjal 1.

3.4 Litun

3.4.1 Hematoxylin og Eosin litun

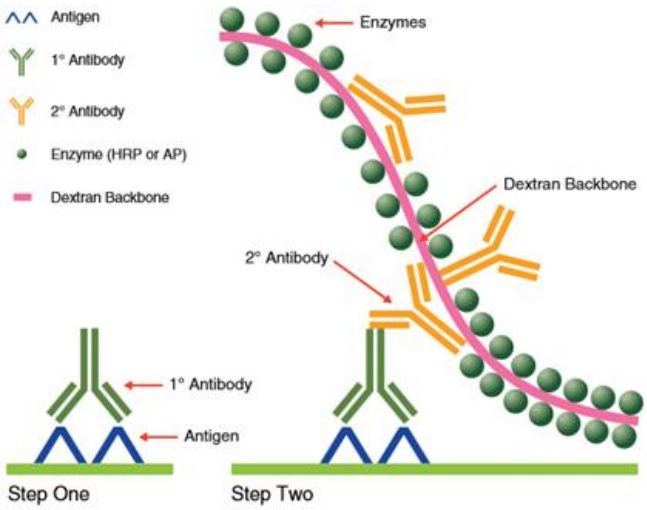
Hvert sýni er litað með H&E litun sem byggist á kjarna og umfrymislitun. Hematoxylinið binst neikvætt hlöðnum hópum kjarnans og litar þá bláa en Eosinið binst jákvætt hlöðnum hópum umfrymisins og litar þá bleika. Þessi litun er notuð til samanburðar við greiningu á mótefnalitun (Carson o.fl., 2009). Sjá nánari aðferðalýsingu í fylgiskjali 1.

3.4.2 Mótefnalitun

Mótefnalitun var framkvæmd með þremur mismunandi mótefnum fyrir hvert sýni í Autostainer Link 48 litunarvél (Dako). Notað var Envision™ Flex/HRP K8000 kit (Dako). Mótefnin sem notuð voru í lituninni voru anti-human cytokeratin 7 og 20 (Dako) og anti-human TTF-1 (Leica) sjá töflu 1. Öll mótefnin voru einstofna mótefni úr mús (1° mótefni) og tengimótefnið (2° mótefni) er anti-músar og anti-kanínu mótefni ásamt HRP (horseradish peroxidase) ensími sem tengd eru við dextran fjölliðu. Chromogen (3,3‘ diaminobenzidine, DAB) er síðan sett á sem er hvatað af ensíminu HRP og við það myndast útfall sjá mynd 1. Eftir litunina voru sýnin tekin úr vélinni og skoluð í vatni, þurrkaðar og kjarnalitaðar með Hematoxylini og blámaðar með 1% ammoníaki. Að lokum voru sýnarglerin settar í alkóhól og xylene og þekjugler límt yfir sneiðarnar. Sjá nánari aðferðalýsingu í fylgiskjali 2.

Tafla 1. Upplýsingar um mótefnin sem notuð voru í rannsókninni.

Mótefni gegn	Klón	Framleiðandi	Þynning	Retrieval aðferð pH9	Buffer lausn
TTF-1	SPT24	Leica	1:50	Vatnsbað	Envision flex wash buffer
CK7	OV-TL 12/30	Dako	1:200	Vatnsbað	Envision flex wash buffer
CK20	K_s 20.8	Dako	1:100	Vatnsbað	Envision flex wash buffer



Mynd 1. Tveggja þrepa fjölliðu aðferð (Envision™)

HRP ensímsameindir og tengimótefni (2° antibody) sem eru anti-kanínu eða anti-músar mótefni eru föst við fjölliðuna. Þau tengist svo einstofna mótefninu (1° mótefni, músa eða kanínu) sem er tengt mótefnavakanum (antigen) í vefnum. Chromogen (3,3‘ diaminobenzidine, DAB) er síðan sett á sem er hvatað af ensíminu HRP og við það myndast brúnt útfall (Dako, 2006).

3.5 Viðmiðunarsýni

Sérstök viðmiðunarsýni eru notuð fyrir hvert mótefni sem litað er hverju sinni. Notast er við vef sem vitað er fyrirfram að gefur mjög góða svörun við mótefninu til að hafa samanburð á því hvort að litunin hafi verið í lagi. Vefur úr skjaldkirtli er notaður til viðmiðunar fyrir TTF-1, vefir úr brisi, lifur, botnlanga og eitli eru notaðir fyrir CK7 og vefur úr botnlanga er notaður fyrir CK20.

3.6 Smásjárskoðun og mat á vefjasýnum

Öll sýnin voru skoðuð í ljóssmásjá og metin af meinafræðingunum Jóni Gunnlaugi Jónassyni og Bjarna A. Agnarssyni ásamt nemanda. Sýnin voru metin eftir styrkleika og dreifanleika litunarinnar í eftirfarandi flokka

a) Sterk litun og dreifð
b) Sterk litun og staðbundin
c) Veik litun og dreifð
d) Veik litun og staðbundin
e) Engin marktæk litun

Ef aðeins örfáar frumur eða mjög lítið hlutfall frumna lituðust jákvætt þá var það tekið fram sérstaklega.

3.7 Úrvinnsla gagna

Notað var Microsoft Excel við úrvinnslu á gögnum og við uppsetningu á súluritum. Lýsandi tölfræði var beitt í rannsókninni þ.e. tjáning þriggja mótefna (TTF-1, CK7 og CK20) var greind í mismunandi krabbameinum og útreikningar á innbyrðis hlutfalli þeirra fengið.

4 Niðurstöður

4.1 Almennar niðurstöður

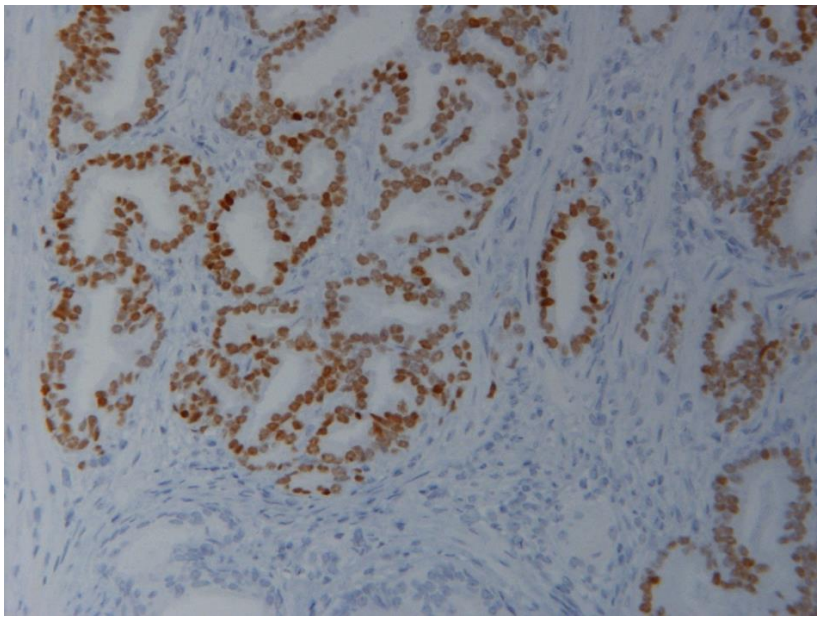
Alls voru 61 sýni úr 13 mismunandi vefjum metin með þremur mismunandi mótefnalitunum og Hematoxylin og Eosin litun. Fjórar mismunandi vefjategundir lungnakrabbameins og þrjár mismunandi tegundir eggjastokkakrabbameins voru litaðar, en í öðrum líffærum var ekki greint á milli vefjategunda (sjá nánar töflu 2). Tveir kubbar voru notaðir frá einu æxlinu sem er kirtil-flöguþekjukrabbamein (adenosquamous carcinoma) þar sem kom fram tvenns konar æxlisgerð innan æxlisins, annarsvegar kirtilmyndandi og illaþroskaður þáttur og hinsvegar flöguþekjuþáttur.

Tafla 2. Fjöldi mismunandi æxla í rannsókninni og innbyrðis hlutfall þeirra.

Vefjagerðir	Fjöldi (N=61)
Lunga smáfrumukrabbamein	5
Lunga kirtilmyndandi krabbamein	6
Lunga flöguþekjukrabbamein	5
Lunga stórfrumukrabbamein	5
Nýrnakrabbamein	5
Ristilkrabbamein	5
Brjóstakrabbamein	5
Briskrabbamein	5
Magakrabbamein	5
Blöðruhálskirtilskrabbamein	5
Eggjastokkar endometrioid	3
Eggjastokkar serous	4
Eggjastokkar mucinous	3

4.2 Mótefnalitun með TTF-1

Þegar vefjasneiðar voru litaðar með mótefninu TTF-1 kom í ljós að smáfrumukrabbamein, kirtilmyndandikrabbamein og stórfrumukrabbamein í lungum lituðust jákvæð með sterka og dreifða litun í 80% tilfella eða meira í öllum vefjagerðum. Í flöguþekjukrabbameini í lungum var eitt sýni af fimm jákvætt og greindist það veikt og staðbundið. Í bris- og magakrabbameini var eitt af fimm sýnum jákvæð í hvoru tveggja með veika staðbundna litun. Tvö af fimm blöðruhálskirtilskrabbameinum voru jákvæð, þar á meðal var eitt sýni sem sýndi sterka og staðbundna litun á afmörkuðu en greinilegu svæði (sjá mynd 2) og annað sýnið var veikt og staðbundið. Helmingur af eggjastokkakrabbameinum greindust jákvæð fyrir mótefninu, fjögur voru sterk og staðbundin en eitt veikt og staðbundið. Í þremur eggjastokka sýnum voru mjög fáar frumur að litast jákvæðar. TTF-1 var ekki tjáð í nýrna-, ristil- og brjóstakrabbameinum. Í töflu 3 og á mynd 3 má sjá tjáningu TTF-1 í mismunandi krabbameinum. Í þessari rannsókn var talið ákjósanlegt að sína niðurstöður bæði í töflum og súluritum því þau bæta hvort annað upp.



Mynd 2. Tjáning TTF-1 í blöðruhálskirtilskrabbameini (í 200x stækkun).

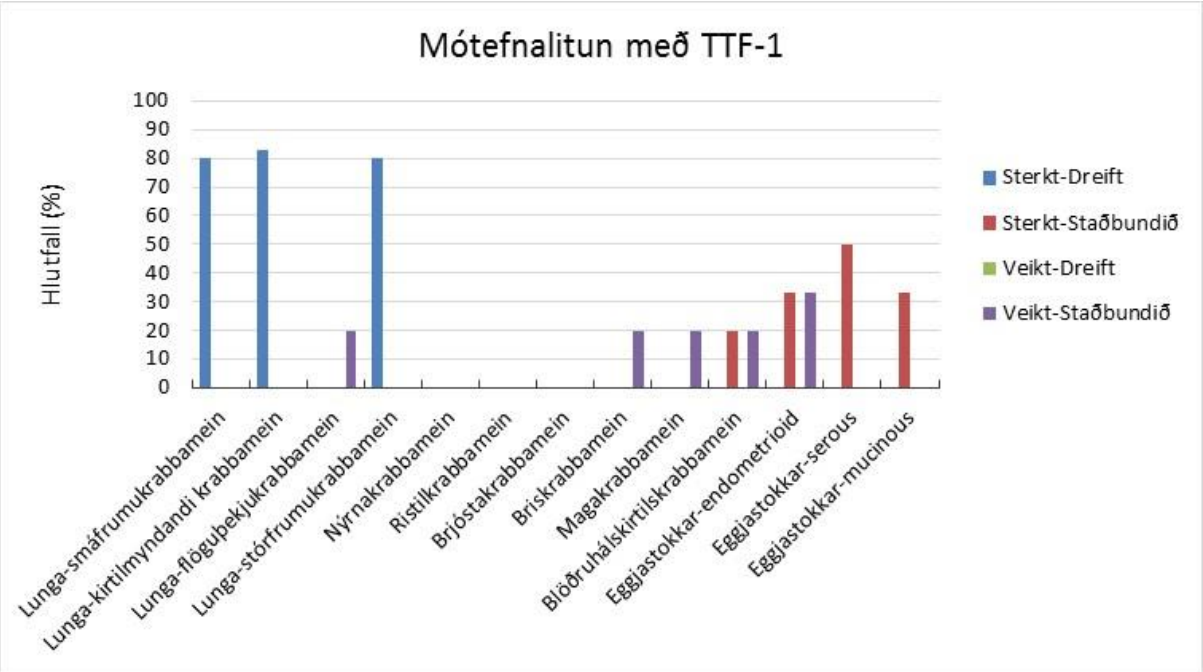
Sterk og staðbundin litun með mótefninu TTF-1 á afmörkuðu en mjög greinilegu svæði í æxlisvef blöðruhálskirtils.

Tafla 3. Tjáning TTF-1 í mismunandi krabbameinum.

TTF-1	Neikvætt	Sterkt-dreift	Sterkt-staðbundið	Veikt-dreift	Veikt-staðbundið
Lunga - smáfrumukrabbamein (n = 5)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - kirtilmyndandi krabbamein (n = 6)	1 (17%)	5 (83%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - flöguþekjukrabbamein (n = 5)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Lunga – stórfrumukrabbamein (n = 5)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Nýrnakrabbamein (n = 5)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ristilkrabbamein (n = 5)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Brjóstakrabbamein (n = 5)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Briskrabbamein (n = 5)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Magakrabbamein (n = 5)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Blöðruhálskirtilskrabbamein (n = 5)	3 (60%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	1 (20%)
Eggjastokkar - endometrioid (n = 3)	1 (33%)	0 (0%)	1 (33%)*	0 (0%)	1 (33%)
Eggjastokkar - serous (n = 4)	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)**	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - mucinous (n = 3)	2 (67%)	0 (0%)	1 (33%)	0 (0%)	0 (0%)

*Fáar frumur að litast jákvæðar í einu sýni.

**Fáar frumur að litast jákvæðar í tveimur sýnum.



Mynd 3. Tjáning TTF-1 í mismunandi krabbameinum.

TTF-1, Thyroid transcription factor

Staðbundið, Ákveðin svæði eða frumur æxlisins litast jákvæðar.

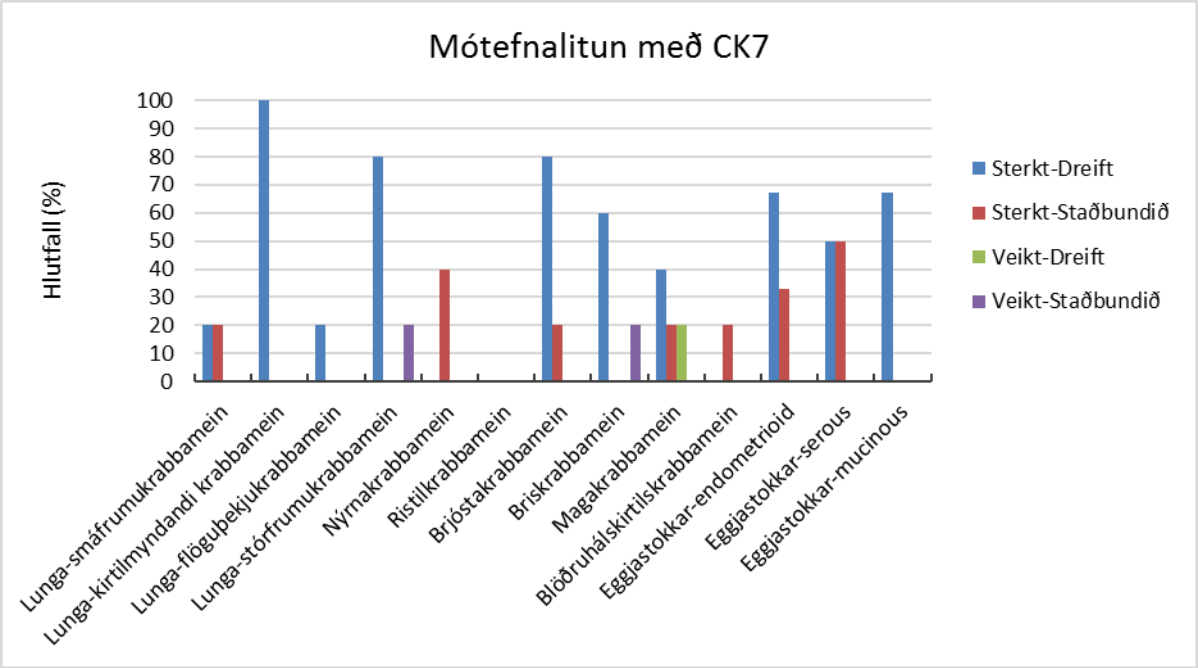
4.3 Mótefnalitun með CK7

Tjáning CK7 í stórfrumu- og kirtilmyndandi krabbameini í lungum og brjóstakrabbameini var jákvætt í 100% tilfella með sterka og dreifða litun nema eitt sýni í stórfrumukrabbameini sem var með veika og staðbundna litun og eitt sýni í brjóstakrabbameini sem greindist með sterka staðbundna litun. Í bris- og magakrabbameini var CK7 jákvætt í 80% tilfella og eggjastokkakrabbamein í 90% tilfella. Engin tjáning var í ristilkrabbameini og aðeins eitt sýni greindist jákvætt í blöðruhálskirtilskrabbameini. Í töflu 4 og á mynd 4 má sá tjáningu CK7 í mismunandi krabbameinum.

Í fjórum af fimm sýnum í blöðrhálskirtilskrabbameini greindust æxlin neikvæð fyrir CK7 en mestur hluti af eðlilegum vef var að litast sterkt jákvæður (sjá mynd 5).

Tafla 4. Tjáning CK7 í mismunandi krabbameinum.

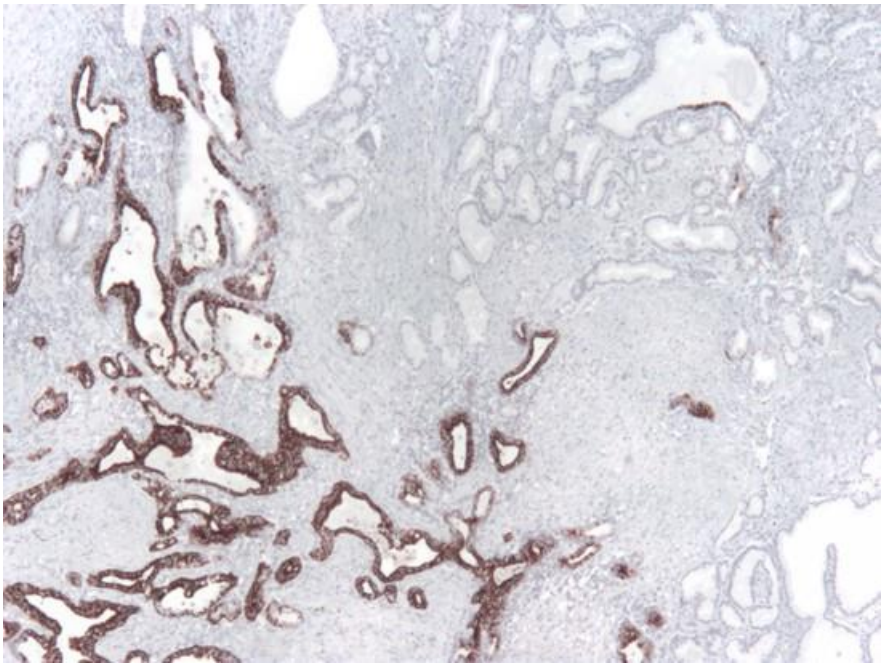
CK7	Neikvætt	Sterkt-dreift	Sterkt-staðbundið	Veikt-dreift	Veikt-staðbundið
Lunga – smáfrumukrabbamein (n = 5)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - kirtilmyndandi krabbamein (n = 6)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - flöguþekjukrabbamein (n = 5)	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - stórfrumukrabbamein (n = 5)	0 (0%)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Nýrnakrabbamein (n = 5)	3 60%	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
Ristilkrabbamein (n = 5)	5 100%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Brjóstakrabbamein (n = 5)	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Briskrabbamein (n = 5)	1 (20%)	3 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Magakrabbamein (n = 5)	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)
Blöðruhálskirtilskrabbamein (n = 5)	4 (80%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar- endometrioid (n = 3)	0 (0%)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - serous (n = 4)	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - mucinous (n = 3)	1 33%	2 (67%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)



Mynd 4. Tjáning CK7 í mismunandi krabbameinum

CK7, Cytokeratin 7

Staðbundið, Ákveðin svæði eða frumur æxlisins litast jákvæðar.



Mynd 5. Tjáning CK7 í blöðruhálskirtli (í 40x stækkun).

Sterk og staðbundin litun með mótefninu CK7 í eðlilegum vef. Æxlisvefur er neikvæður.

4.4 Mótefnalitun með CK20

Í krabbameinum þar sem tjáning CK20 geindist jákvæð var alls staðar um sterka og staðbundna litun að ræða nema í einu magakrabbameinssýni þar sem sterk og dreifð litun greindist. Tjáning CK20 er 100% í ristilkrabbameinum og mucinous krabbameinum í eggjastokkum. Í magakrabbameinum var mótefnið jákvætt í 80% tilfella og í 60% í briskrabbameinum. Engin tjáning CK20 greindist í smáfrumu- og flöguþekjukrabbameini í lungum, nýrnakrabbameini, brjóstakrabbameini og serous krabbameini í eggjastokkum. Í töflu 5 og á mynd 6 má sjá tjáningu CK20 í mismunandi krabbameinum.

Í töflu 6 má sjá tjáningamynstur CK7 og CK20 borið saman þar sem tjáning CK7 í brjóstakrabbameini og serous æxlum í eggjastokkum er í 100% tilfella og tjáning CK20 er engin en í ristilkrabbameini er tjáning CK20 aftur á móti 100% en þá er tjáning CK7 engin.

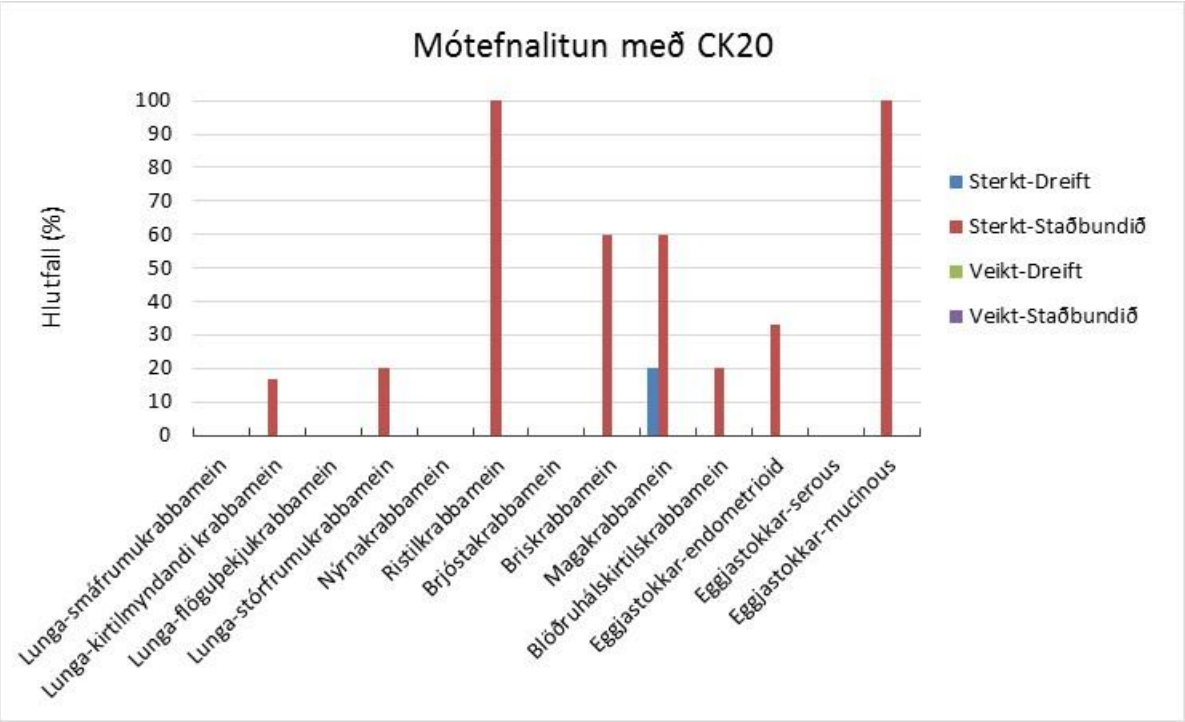
Forvitnileg litun kom fram í einu mucinous æxli í eggjastokk sem sýndi tjáningu CK20 í ákveðnum frumum æxlisins og sömu frumur sem voru jákvæðar fyrir CK20 voru neikvæðar fyrir TTF-1 en þær frumur sem lituðust sterkt jákvæðar fyrir TTF-1 reyndust neikvæðar í CK20 (sjá nánar myndir 7 og 8). Einnig eru upplýsingar um öll sýnin og mótefnin í fylgiskjali 3.

Tafla 5. Tjáning CK20 í mismunandi krabbameinum.

CK20	Neikvætt	Sterkt-dreift	Sterkt-staðbundið	Veikt-dreift	Veikt-staðbundið
Lunga – smáfrumukrabbamein (n = 5)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - kirtilmyndandi krabbamein (n = 6)	5 (83%)	0 (0%)	1 (17%)*	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - flöguþekjukrabbamein (n = 5)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga - stórfrumukrabbamein (n = 5)	4 (80%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Nýrnakrabbamein (n = 5)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ristilkrabbamein (n = 5)	0 (0%)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Brjóstakrabbamein (n = 5)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Briskrabbamein (n = 5)	2 (40%)	0 (0%)	3 (60%)**	0 (0%)	0 (0%)
Magakrabbamein (n = 5)	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)*	0 (0%)	0 (0%)
Blöðruhálskirtilskrabbamein (n = 5)	4 (80%)	0 (0%)	1 (20%)*	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - endometrioid (n = 3)	2 (67%)	0 (0%)	1 (33%)*	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - serous (n = 4)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - mucinous (n = 3)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

*Fáar frumur að litast jákvæðar í einu sýni.

**Fáar frumur að litast jákvæðar í tveimur sýnum.



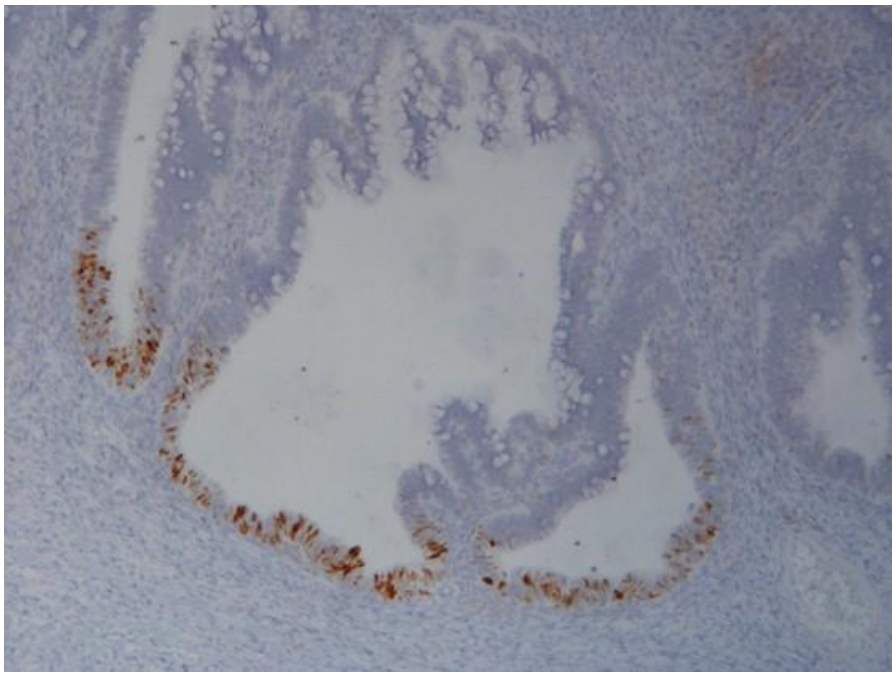
Mynd 6. Tjáning CK20 í mismunandi krabbameinum.

CK20, Cytokeratin 20

Staðbundið, Ákveðin svæði eða frumur æxlisins litast jákvæðar

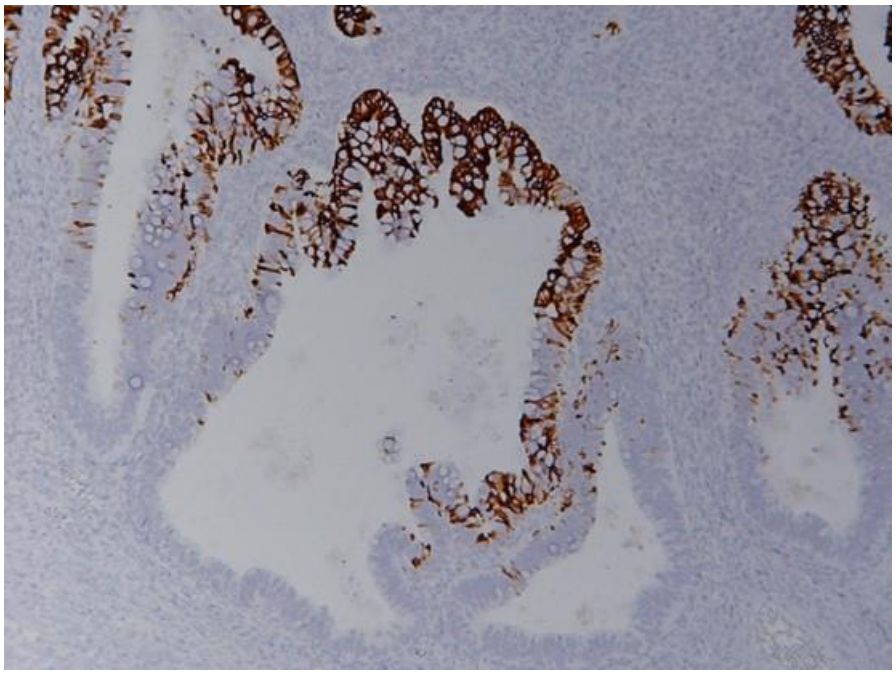
Tafla 6. Tjáningamynstur CK7 og CK20 í mismunandi krabbameinum.

	CK7+/CK20+	CK7+/CK20-	CK7-/CK20+	CK7-/CK20-
Lunga – smáfrumukrabbamein (n = 5)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	3 (60%)
Lunga - kirtilmyndandi krabbamein (n = 6)	1 (17%)	5 (83%)	0 (0%)	0 (0%)
Lunga -flöguþekjukrabbamein (n = 5)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	4 (80%)
Lunga - stórfrumukrabbamein (n = 5)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)
Nýrnakrabbamein (n = 5)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	4 (60%)
Ristilkrabbamein (n = 5)	0 (0%)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)
Brjóstakrabbamein (n = 5)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Briskrabbamein (n = 5)	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	0 (0%)
Magakrabbamein (n = 5)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)
Blöðruhálskirtilskrabbamein (n = 5)	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)
Eggjastokkar - endometrioid (n = 3)	1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - serous (n = 4)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Eggjastokkar - mucinous (n = 3)	2 (67%)	0 (0%)	1 (33%)	0 (0%)



Mynd 7. Tjáning TTF-1 í eggjastokkum (í 100x stækkun).

Sterk og staðbundin litun með mótefninu TTF-1 á afmörkuðu svæði í mucinous æxlisvef eggjastokka. Sama svæði og sést á mynd 7.



Mynd 8. Tjáning CK20 í eggjastokkum (í 100x stækkun).

Sterk og staðbundin litun með mótefninu CK20 á afmörkuðu svæði í mucinous æxlisvef eggjastokka. Sama svæði og sést á mynd 6. Þar sem vefurinn sýndi tjáningu CK20 í ákveðnum frumum æxlisins og sömu frumur sem voru jákvæðar fyrir CK20 voru neikvæðar fyrir TTF-1 en þær frumur sem lituðust sterkt jákvæðar fyrir TTF-1 reyndust neikvæðar í CK20.

5 Umræða

Tjáning TTF-1, CK7 og CK20 var metin í 13 mismunandi vefjategundum og samtals 61 sýni. Í þessari rannsókn greindist TTF-1 jákvætt í níu vefjategundum þar á meðal í brisi, maga, blöðruhálskirtli og eggjastokkum. Tjáning CK7 greindist a.m.k. að hluta til í öllum krabbameinum nema ristilkrabbameini.

Í lungnakrabbameinum var TTF-1 jákvætt í smáfrumu-, kirtilmyndandi- og stórfrumukrabbameini í 80% tilfella eða meira með sterka dreifða litun og í flöguþekjukrabbameini var eitt sýni með veika og staðbundna litun (20%). Aðrar rannsóknir benda til að TTF-1 sé jákvætt í stórfrumukrabbameini í um 25-47% tilfella (Kaufmann o.fl., 2000; Khoor o.fl., 1999; Matoso o.fl., 2010) en í þessari rannsókn er það að greinast í 80% tilfella sem er töluvert hærra. Veik og staðbundin litun greindist í 20% tilfella í bæði bris- og magakrabbameini en lítil sem engin litun hefur verið að greinast í þessum æxlum þessara líffæra (Matoso o.fl., 2010). Í blöðruhálskirtilskrabbameini greindust 40% sýna jákvæð fyrir TTF-1, 20% greindust með sterka og staðbundna litun og 20% með veika og staðbundna litun. Þetta er töluvert hátt hlutfall í samanburði við aðrar rannsóknir þar sem tjáning TTF-1 í blöðruhálskirtli hefur verið mjög lítil eða um 1,2% eða minna (Bejarano o.fl., 1996; Matoso o.fl., 2010). Helmingur af eggjastokkakrabbameinum greindust jákvæð fyrir TTF-1 eða alls 5 sýni (tvö af þremur endometrioid, tvö af fjórum serous og eitt af þremur mucinous). Nýlegar rannsóknir sýna að TTF-1 er að greinast jákvætt í um 13% tilfella í eggjastokkakrabbameinum sem er mun lægra en það sem greinist í þessari rannsókn.

Tjáning CK7 í lungnakrabbameinum er mest í kirtilmyndandi krabbameini og stórfrumukrabbameini og minnst í flöguþekjukrabbameini sem samræmist niðurstöðum eldri rannsókna (Nagashio o.fl., 2010). Í nýrnakrabbameinum var tjáning CK7 aðeins hærri heldur en það sem eldri rannsóknir gefa til kynna (Chu o.fl., 2000). CK7 var tjáð í meirihluta brjósta-, bris- og magakrabbameins og einnig í endometrioid og serous (non-mucinous) æxlum eggjastokka. Þar af var 100% tjáning í brjóstakrabbameini og non-mucinous æxlum eggjastokka. Þessar niðurstöður eru mjög svipaðar niðurstöðum fyrri rannsókna (Chu o.fl., 2000; Hamilton o.fl., 2000; So Yeon Park o.fl., 2002; Tot, 2002). Í mucinous æxlum eggjastokka var tjáning CK7 í um 66% tilfella en samkvæmt Vang o.fl. er það að greinast í um 95% tilfella (Vang o.fl., 2006).

Fyrri rannsóknir benda til að lítil sem engin tjáning CK20 sé í lungnakrabbameinum (Cheuk o.fl., 2001; Chu o.fl., 2000; William D. Travis o.fl., 2004) en samkvæmt okkar niðurstöðum var CK20 að greinast í kirtilmyndandi krabbameini og stórfrumukrabbameini í lungum í 17-20% tilfella. CK20 greindist töluvert hátt í magakrabbameini eða um 80% tilfella en samkvæmt Park o.fl. er það að greinast í um 41% tilfella (So Yeon Park o.fl., 2002). Hlutfall CK20 í öðrum krabbameinum var mjög svipað fyrri rannsóknum.

Iðulega er talið heppilegra í mótefnalitun og í greiningu krabbameina að niðurstaða sé jákvæð en neikvæð niðurstaða getur þó líka verið mjög hjálpleg við greiningu. Það vakti athygli rannsakenda að í fjórum af fimm vefjasýnum frá blöðrhálskirtilskrabbameini reyndust æxlin neikvæð fyrir CK7 en mestur hluti af eðlilegum blöðruhálskirtilsvef var að litast sterkt jákvæður. Þessu hefur ekki verið lýst áður svo okkur sé kunnugt um en getur mjög vel orðið til aðstoðar meinafræðingum ef frekari rannsóknir styðja þessa niðurstöðu.

Veikleikar þessarar rannsóknar eru einkum þeir að of fá sýni voru lituð af hverri æxlistegund sem gefur þar af leiðandi ekki eins áreiðanlegar og marktækar niðurstöður eins og ef mun fleiri sýni hefðu verið lituð. Hins vegar eru að vissu leyti kostir rannsóknarinnar að mikill fjölbreytileiki í æxlisgerðum var til staðar og því unnt að sýna fram á hvað mótefnalitunin getur verið fjölbreytileg. Niðurstöður rannsóknarinnar gefa því ákveðnar vísbendingar um fjölbreytileika litana, einkum TTF-1 litunar í hinum mismunandi æxlum og styður þá vísbendingu sem komið hefur fram á síðustu árum að næmi og sértækni þessarar litunar fyrir krabbameini í lungum (og reyndar skjaldkirtilsæxlum) er ekki eins gott og áður hafði verið talið. Frekari rannsóknir eru þó nauðsynlegar til að auka áreiðanleika niðurstaðna þessarar rannsóknar.

6 Ályktanir

Niðurstöður þessara rannsóknar benda til að mótefnið TTF-1 sé að litast í einhverjum hluta æxla utan lungna og skjaldkirtils. Töluverður hluti blöðruhálskirtilskrabbameina og eggjastokkakrabbameina tjáði TTF-1. Vert er að athuga þetta enn frekar með því að auka fjölda sýna og auka þannig áreiðanleika þessara niðurstaðna. Einnig vakti það athygli að CK7 var neikvætt í æxlisvef blöðruhálskirtils í þessari rannsókn, en yfirleitt sterkt jákvætt í eðlilegum blöðruhálskirtilsvef. Þessi niðurstaða gæti komið meinafræðingum að notum, en þyrfti þó að rannsaka betur.

Heimildaskrá

Baars, J. H., Deruijter, J. L. M., Smedts, F., Vanniekerk, C. C., Poels, L. G., Seldenrijk, C. A. o.fl. (1994). The applicability of a keratin 7 monoclonal-antibody in routinely papanicolaou-stained cytologic specimens for the differential-diagnosis of carcinomas. [Article]. *American Journal of Clinical Pathology, 101*(3), 257-261.

Batge, B., Bosslet, K., Sedlacek, H. H., Kern, H. F. & Kloppel, G. (1986). Monoclonal antibodies against CEA-related components discriminate between pancreatic duct type carcinomas and nonneoplastic duct lesions as well as nonduct type neoplasias. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 408*(4), 361-374.

Bayrak, R., Yenidunya, S. & Haltas, H. (2011). Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Res Pract, 207*(3), 156-160. doi: 10.1016/j.prp.2010.12.005

Bejarano, P. A., Baughman, R. P., Biddinger, P. W., Miller, M. A., Fenoglio-Preiser, C. & al-Kafaji, B. (1996). Surfactant proteins and thyroid transcription factor-1 in pulmonary and breast carcinomas. *Mod Pathol, 9*, 445-452.

Bishop, J. A., Sharma, R. & Illei, P. B. (2010). Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Hum Pathol, 41*(1), 20-25. doi: 10.1016/j.humpath.2009.06.014

Brawer, M. K., Peehl, D. M., Stamey, T. A. & Bostwick, D. G. (1985). Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res, 45*(8), 3663-3667.

Cangemi, V., Volpino, P., D'Andrea, N., Puopolo, M., Fabrizi, S., Lonardo, M. T. o.fl. (1995). Local and/or distant recurrences in T1-2/N0-1 non-small cell lung cancer. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 9*(9), 473-478.

Carson, F. L. & Hladik, C. (Eds.). (2009). *Histotechnology a self-instructional text* (3rd ed.). Dallas: American society for clinical pathology press.

Cheuk, W., Kwan, M. Y., Suster, S. & Chan, J. K. (2001). Immunostaining for thyroid transcription factor 1 and cytokeratin 20 aids the distinction of small cell carcinoma from Merkel cell carcinoma, but not pulmonary from extrapulmonary small cell carcinomas. *Arch Pathol Lab Med, 125*(2), 228-231. doi: 10.1043/0003-9985(2001)125<0228:ifttfa>2.0.co;2

Chhieng, D. C., Cangiarella, J. F., Zakowski, M. F., Goswami, S., Cohen, J.-M. & Yee, H. T. (2001). Use of thyroid transcription factor 1, PE-10, and cytokeratins 7 and 20 in discriminating between primary lung carcinomas and metastatic lesions in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Cancer Cytopathology, 93*(5), 330-336. doi: 10.1002/cncr.9048

Cho, N. H., Park, C. & Park, D. S. (1997). Expression of alpha-1-antichymotrypsin in prostate carcinoma. *J Korean Med Sci, 12*(3), 228-233.

Chu, P., Wu, E. & Weiss, L. M. (2000). Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol, 13*(9), 962-972. doi: 10.1038/modpathol.3880175

Colby, T. V., Koss, M. N. & Travis, W. D. (Eds.). (1994). *Atlas of tumor pathology, tumors of the lower respiratory tract*. Washington: AFIP.

Dako. (2006). Education Guide: Immunohistochemical staining methods 4th ed., from Sótt 25. mars 2013 af:http://www.crh.ed.ac.uk/surf/files/2011/10/DAKO-IHC-Guide.pdf

Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I. & Sesterhenn, I. A. (Eds.). (2004). *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon: IARC press.

Fabbro, D., Di Loreto, C., Stamerra, O., Beltrami, C. A., Lonigro, R. & Damante, G. (1996). TTF-1 gene expression in human lung tumours. *Eur J Cancer, 32A*(3), 512-517.

Fujiwara, S., Nawa, A., Nakanishi, T., Shimoyama, Y., Kajiyama, H., Shibata, K. o.fl. (2010). Thyroid transcription factor 1 expression in ovarian carcinomas is an independent prognostic factor. *Human Pathology, 41*(4), 560-565. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2009.09.010

Genega, E. M., Hutchinson, B., Reuter, V. E. & Gaudin, P. B. (2000). Immunophenotype of high-grade prostatic adenocarcinoma and urothelial carcinoma. *Mod Pathol, 13*(11), 1186-1191. doi: 10.1038/modpathol.3880220

Hamilton, S. R. & Aaltonen, L. A. (Eds.). (2000). *Pathology and genetics, tumors of the digestive system*. Lyon IARC press.

Haque, A. K., Syed, S., Lele, S. M., Freeman, D. H. & Adegboyega, P. A. (2002). Immunohistochemical study of thyroid transcription factor-1 and HER2/neu in non-small cell lung cancer: strong thyroid transcription factor-1 expression predicts better survival. *Appl Immunohistochem Mol Morphol, 10*(2), 103-109.

Harnden, P., Mahmood, N. & Southgate, J. (1999). Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. *Lancet, 353*(9157), 974-977. doi: 10.1016/s0140-6736(98)05383-5

Holzinger, A., Dingle, S., Bejarano, P. A., Miller, M. A., Weaver, T. E. & DiLauro, R. (1996). Monoclonal antibody to thyroid transcription factor-1: production, characterization, and usefulness in tumor diagnosis. *Hybridoma, 15*, 49-53.

Jónasson, J. G. & Tryggvadóttir, L. (2012). Krabbamein á Íslandi - Upplýsingar úr krabbameinsskrá fyrir tímabilið 1955-2010, from http://www.krabbameinsskra.is/?id=krabbamein_a_islandi

Kaufmann, O. & Dietel, M. (2000). Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathology, 36*(1), 8-16.

Khoor, A., Whitsett, J. A., Stahlman, M. T., Olson, S. J. & Cagle, P. T. (1999). Utility of surfactant protein B precursor and thyroid transcription factor 1 in differentiating adenocarcinoma of the lung from malignant mesothelioma. *Human Pathology, 30*(6), 695-700. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90096-5

Lastraioli, E., Raffaella Romoli, M. & Arcangeli, A. (2012). Immunohistochemical Biomarkers in Gastric Cancer Research and Management. *International Journal of Surgical Oncology, 2012*, 9. doi: 10.1155/2012/868645

Leroy, X., Moukassa, D., Copin, M. C., Saint, F., Mazeman, E. & Gosselin, B. (2000). Utility of cytokeratin 7 for distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. *Eur Urol, 37*(4), 484-487. doi: 20172

Matoso, A., Singh, K., Jacob, R., Greaves, W. O., Tavares, R., Noble, L. o.fl. (2010). Comparison of thyroid transcription factor-1 expression by 2 monoclonal antibodies in pulmonary and nonpulmonary primary tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol, 18*(2), 142-149. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181bdf4e7

McGregor, D. K., Khurana, K. K., Cao, C., Tsao, C. C., Ayala, G., Krishnan, B. o.fl. (2001). Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: the use of the monoclonal antibody 'Renal Cell Carcinoma Marker'. *Am J Surg Pathol, 25*(12), 1485-1492.

Mills, S. E., Carter, D., Greenson, J. K., Oberman, H. A., Reuter, V. & Stoler, M. H. (Eds.). (2004). *Sternberg´s diagnostic surgical pathology* (4th ed.): Lippincott Williams & Wilkins.

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell, 31*(1), 11-24.

Moll, R., Lowe, A., Laufer, J. & Franke, W. W. (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol, 140*(2), 427-447.

Nagashio, R., Sato, Y., Matsumoto, T., Kageyama, T., Satoh, Y., Ryuge, S. o.fl. (2010). Significant high expression of cytokeratins 7, 8, 18, 19 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinomas, compared to small cell lung carcinomas. *Pathol Int, 60*(2), 71-77. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02487.x

Nakamura, N., Miyagi, E., Murata, S.-i., Kawaoi, A. & Katoh, R. (2002). Expression of Thyroid Transcription Factor-1 in Normal and Neoplastic Lung Tissues. *Mod Pathol, 15*(10), 1058-1067.

Park, S. Y., Kim, B. H., Kim, J. H., Lee, S. & Kang, G. H. (2007). Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med, 131*(10), 1561-1567. doi: 10.1043/1543-2165(2007)131[1561:poimhd]2.0.co;2

Park, S. Y., Kim, H. S., Hong, E. K. & Kim, W. H. (2002). Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colorectum and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary. *Human Pathology, 33*(11), 1078-1085. doi: http://dx.doi.org/10.1053/hupa.2002.129422

Prasad, S. R., Humphrey, P. A., Catena, J. R., Narra, V. R., Srigley, J. R., Cortez, A. D. o.fl. (2006). Common and uncommon histologic subtypes of renal cell carcinoma: imaging spectrum with pathologic correlation. *Radiographics, 26*(6), 1795-1806; discussion 1806-1710. doi: 10.1148/rg.266065010

Quint, L. E., Tummala, S., Brisson, L. J., Francis, I. R., Krupnick, A. S., Kazerooni, E. A. o.fl. (1996). Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery, 62*(1), 246-250. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975(96)00220-2

Ramaekers, F., van Niekerk, C., Poels, L., Schaafsma, E., Huijsmans, A., Robben, H. o.fl. (1990). Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas. *Am J Pathol, 136*(3), 641-655.

Reis-Filho, J. S., Carrilho, C., Valenti, C., Leitao, D., Ribeiro, C. A., Ribeiro, S. G. o.fl. (2000). Is TTF1 a good immunohistochemical marker to distinguish primary from metastatic lung adenocarcinomas? *Pathol Res Pract, 196*(12), 835-840.

Sanderson, R. D. & Bernfield, M. (1988). Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 85*(24), 9562-9566.

Sasaki, S., Masaki, T., Umetani, N., Futakawa, N., Ando, H. & Muto, T. (1998). Characteristics in Primary Signet-ring Cell Carcinoma of the Colorectum, from Clinicopathological Observations. *Japanese Journal of Clinical Oncology, 28*(3), 202-206. doi: 10.1093/jjco/28.3.202

Scarpatetti, M., Tsybrovskyy, O. & Popper, H. H. (2002). Cytokeratin typing as an aid in the differential diagnosis of primary versus metastatic lung carcinomas, and comparison with normal lung. *Virchows Archiv, 440*(1), 70-76. doi: 10.1007/s004280100508

Scully, R. E. & Sobin, L. H. (Eds.). (1999). *World health organization: Histological typing of ovarian tumours* (2nd ed.). Berlin: Springer.

Sheppard. (2000). Specific markers for pulmonary tumours. *Histopathology, 36*(3), 273-276. doi: 10.1046/j.1365-2559.2000.00912.x

Simon, G. R. & Turrisi, A. (2007). Management of small cell lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest, 132*(3 Suppl), 324S-339S. doi: 10.1378/chest.07-1385

Soslow, R. A. (2008). Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol, 27*(2), 161-174. doi: 10.1097/PGP.0b013e31815ea812

Stenbygaard, L. E., Sorensen, J. B., Larsen, H. & Dombernowsky, P. (1999). Metastatic pattern in non-resectable non-small cell lung cancer. *Acta Oncologica, 38*(8), 993-998.

Storey, D. J., Rush, R., Stewart, M., Rye, T., Al-Nafussi, A., Williams, A. R. o.fl. (2008). Endometrioid epithelial ovarian cancer : 20 years of prospectively collected data from a single center. *Cancer, 112*(10), 2211-2220. doi: 10.1002/cncr.23438

Sturm, N., Lantuéjoul, S., Laverrière, M.-H., Papotti, M., Brichon, P.-Y., Brambilla, C. o.fl. (2001). Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 (34βE12) expression in basaloid and large-cell neuroendocrine carcinomas of the lung. *Human Pathology, 32*(9), 918-925. doi: http://dx.doi.org/10.1053/hupa.2001.27110

Tavassoli, F. A. & Devilee, P. (Eds.). (2003). *Pathology & genetics, tumors of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC press.

Terada, T., Ohta, T., Sasaki, M., Nakanuma, Y. & Kim, Y. S. (1996). Expression of MUC apomucins in normal pancreas and pancreatic tumours. *J Pathol, 180*(2), 160-165. doi: 10.1002/(sici)1096-9896(199610)180:2<160::aid-path625>3.0.co;2-a

Terasaki, H., Niki, T., Matsuno, Y., Yamada, T., Maeshima, A., Asamura, H. o.fl. (2003). Lung Adenocarcinoma With Mixed Bronchioloalveolar and Invasive Components: Clinicopathological Features, Subclassification by Extent of Invasive Foci, and Immunohistochemical Characterization. *Am J Surg Pathol, 27*(7), 937-951.

Tot, T. (2002). Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *European Journal of Cancer, 38*(6), 758-763. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00008-4

Travis, W. D., Brambilla, E., Muller-Hermerlink, H. K. & Harris, C. C. (Eds.). (2004). *Pathology and genetics, tumors of the lung, pleura, thymus and heart.* Lyon: IARC press.

Travis, W. D., Colby, T. V., Corrin, B., Shimosato, Y. & Brambilla, E. (Eds.). (1999). *Histological typing of lung and pleural tumours* (3rd ed.). Berlin: Springer.

Travis, W. D., Travis, L. B. & Devesa, S. S. (1995). Lung cancer. *Cancer, 75*(1 Suppl), 191-202.

Troyanovsky, S. M., Guelstein, V. I., Tchipysheva, T. A., Krutovskikh, V. A. & Bannikov, G. A. (1989). Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *Journal of Cell Science, 93*(3), 419-426.

van Niekerk, C. C., Boerman, O. C., Ramaekers, F. C. & Poels, L. G. (1991). Marker profile of different phases in the transition of normal human ovarian epithelium to ovarian carcinomas. *Am J Pathol, 138*(2), 455-463.

van Niekerk, C. C., Jap, P. H., Ramaekers, F. C., van de Molengraft, F. & Poels, L. G. (1991). Immunohistochemical demonstration of keratin 7 in routinely fixed paraffin-embedded human tissues. *J Pathol, 165*(2), 145-152. doi: 10.1002/path.1711650210

Vang, R., Gown, A. M., Wu, L. S., Barry, T. S., Wheeler, D. T., Yemelyanova, A. o.fl. (2006). Immunohistochemical expression of CDX2 in primary ovarian mucinous tumors and metastatic mucinous carcinomas involving the ovary: comparison with CK20 and correlation with coordinate expression of CK7. *Mod Pathol, 19*(11), 1421-1428. doi: 10.1038/modpathol.3800698

Wieczorek, T. J., Pinkus, J. L., Glickman, J. N. & Pinkus, G. S. (2002). Comparison of thyroid transcription factor-1 and hepatocyte antigen immunohistochemical analysis in the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma, metastatic adenocarcinoma, renal cell carcinoma, and adrenal cortical carcinoma. *Am J Clin Pathol, 118*(6), 911-921. doi: 10.1309/kkdp-mnd2-w794-p9eh

Winchester Md, F. D. J., Chang Md, F. H. R., Graves Md, T. A., Menck Mba, H. R., Bland Md, F. K. I. & Winchester Md, F. D. P. (1998). A Comparative Analysis of Lobular and Ductal Carcinoma of the Breast: Presentation, Treatment, and Outcomes. *Journal of the American College of Surgeons, 186*(4), 416-422. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S1072-7515(98)00051-9

Zamecnik, J. & Kodet, R. (2002). Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Arch, 440*(4), 353-361. doi: 10.1007/s00428-001-0552-2

Zhao, H., Langerød, A., Ji, Y., Nowels, K. W., Nesland, J. M., Tibshirani, R. o.fl. (2004). Different Gene Expression Patterns in Invasive Lobular and Ductal Carcinomas of the Breast. *Molecular Biology of the Cell, 15*(6), 2523-2536. doi: 10.1091/mbc.E03-11-0786

Fylgiskjöl

Fylgiskjal 1

Hematoxylin og Eosin litun

Paraffín innsteyptir vefjabitar skornir í 2,0 µm þykkar sneiðar sem settar eru á venjulegt smásjárgler og inn í 60°C heitan hitaskáp í 18 mín.

1.	Xylene – Paraffín fjarlægt	5 mínútur
2.	Sneiðar þurrkaðar	2 mínútur
3.	Alkohól – Xylene fjarlægt	3 mínútur
4.	Skolað í köldu vatni	
5.	Hematoxylin – kjarnalitun	6 mínútur
6.	Skolað í köldu vatni	
7.	Sýra – aflitun (HCL) (0,5% saltsýra í abs. Alkóhóli)	3 dýfur
8.	Skolað í köldu vatni	
9.	Basi – blámun (1% ammoníak)	4-5 dýfur
10.	Skolað í vatni	2 mínútur
11.	Eosin – umfrymislitun	5 mínútur
12.	Skolað í vatni	
13.	Alkohól	20 sekúndur
14.	Xylene	3 mínútur

Gengið frá glerjum með þekjugleri sem límt er yfir vefjasneiðina.

Fylgiskjal 2

Mótefnalitun með mótefnunum TTF-1, CK7 og CK20 í Autostainer Link 48 frá Dako.

Paraffín innsteyptir vefjabitar skornir í 2,5 µm þykkar sneiðar sem settar eru á starfrost smásjárgler, látnar þorna við 24°C yfir nótt og inn í 60°C heitan hitaskáp í 1 klst.

1.	Xylene – Paraffín fjarlægt	2 x 5 mínútur
2.	Sneiðar þurrkaðar	2 mínútur
3.	Alkohól – Xylene fjarlægt	2 x 5 mínútur
4.	Skolað í köldu vatni (eftir þetta mega sneiðar alls ekki þorna)	
5.	Target retrieval lausn: sneiðar settar í forhitaða lausn í 98°-99°C vatnsbaði (5 ml. Envision FLEX Target Retrival solution, High pH +245 ml. eimað vatn)	20 mínútur
6.	Tekið úr vatnsbaðinu og látið standa í lausninni úti á borði	20 mínútur
7.	Skolað í Envision flex wash buffer og síðan sett í hreinan buffer	
8.	Sýni sett í litavél	
9.	Endogenous enzym block (H_2O_2)	5 mínútur
10.	Skolað í buffer	5 mínútur
11.	Sýni sett í litavél (Autostainer Link 48) Mótefni TTF-1,CK7 og CK20	30 mínútur
12.	Skolað í buffer	
13.	Labelled polymer (Envision FLEX/HRP)	20 mínútur
14.	Skolað í buffer og síðan sett í hreinan buffer	5 mínútur
15.	Substrat chromogen (DAB)	10 mínútur
16.	Skolað í buffer	
17.	Skolað í vatni	
18.	Sneiðar þurrkaðar	
19.	Kjarnalitun með haematoxylini	Nokkrar dýfur
20.	Skolað í vatni	
21.	Basi – 1% ammoníak	5 sekúndur
22.	Sneiðar þurrkaðar	
23.	Alkohól	20 sekúndur
24.	Xylene	3 mínútur

Gengið frá glerjum með þekjugleri sem límt er yfir vefjasneiðina.

Fylgiskjal 3

TTF-1 – Sýnanúmer	Neikvætt	Jákvætt	Sterkt	Veikt	Dreift	Staðbundið
Smáfrumukrabbamein - lunga						
H5158/07-A4		x	x		x	
H6058/09-4		x	x		x	
B64599/12		x	x		x	
B64534/12	x					
B63264/12		x	x		x	
Kirtilmyndandi krabbamein - lunga						
H7272/12-A9	x					
H7130/12-A4		x	x		x	
H6798/12-A4		x	x		x	
H6750/12-A5		x	x		x	
H6144/12-A5		x	x		x	
H5663/12-A4 kirtilmyndnandi þáttur		x	x		x	
(H5663/12-A4 illa þroskaður þáttur)	x					
Flöguþekjukrabbamein - lunga						
H7384/12-F5	x					
H7275/12-i6	x					
H5663/12-B4 flöguþekju þáttur	x					
H4305/12-F4	x					
H4055/12-A4		x		x		x
Stórfrumukrabbamein - lunga						
H800/12-A2		x	x		x	
H3180/09-B	x					
H1474/08-A6		x	x		x	
H1998/10-B5		x	x		x	
H4630/09-9		x	x		x	
Nýrnakrabbamein						
H7421/12-2	x					
H7406/12-3	x					
H7078/12-2	x					
H7057/12-A2	x					
H7048/12-7	x					
Ristilkrabbamein						
H7433/12-A3	x					
H7431/12-1	x					
H7388/12-2	x					
H7357/12-3	x					
H7320/12-5	x					
Brjóstakrabbamein						
H7335/12-5	x					
H7247/12-E5	x					
H7233/12-D6	x					
H7223/12-D2	x					
H7214/12-B7	x					
Briskrabbamein						
H4537/12-A4	x					
H4414/12-A8	x					
H3543/12-4	x					
H6439/11-B5		x		x		x
H5718/11-A6	x					
Magakrabbamein						
H5597/12-A5	x					
H4790/12-9	x					
H4240/12-6	x					
H2340/12-A4	x					
H3644/11-A5		x		x		x
Blöðruhálskirtilskrabbamein						
H7386/12-A10		x	x			x
H7208/12-A19	x					
H6902/12-A43	x					
H6592/12-A37		x		x		x
H6394 /12-32	x					
Eggjastokkar - endometrioid						
H244/11-6	x					
H1568/11-A15		x		x		x
H2914/11-A7		x	x			x
Eggjastokkar – serous						
H6733/11-A3	x					
H113/12-1		x	x			x
H1874/12-A4	x					
H488011-2		x	x			x
Eggjastokkar - mucinous						
H2331/11-A17	x					
H4585/12-A12		x	x			x
H5046/09-A6	x					

CK7 – sýnanúmer	Neikvætt	Jákvætt	Sterkt	Veikt	Dreift	Staðbundið
Smáfrumukrabbamein - lunga						
H5158/07-A4	x					
H6058/09-4		x	x		x	
B64599/12		x	x			x
B64534/12	x					
B63264/12	x					
Kirtilmyndandi krabbamein - lunga						
H7272/12-A9		x	x		x	
H7130/12-A4		x	x		x	
H6798/12-A4		x	x		x	
H6750/12-A5		x	x		x	
H6144/12-A5		x	x		x	
H5663/12-A4 kirtilmyndnandi þáttur		x	x		x	
(H5663/12-A4 illa þroskaður þáttur)		x	x		x	
Flöguþekjukrabbamein - lunga						
H7384/12-F5	x					
H7275/12-i6	x					
H5663/12-B4 flöguþekju þáttur	x					
H4305/12-F4		x	x		x	
H4055/12-A4	x					
Stórfrumukrabbamein – lunga						
H800/12-A2		x	x		x	
H3180/09-B		x	x		x	
H1474/08-A6		x		x		x
H1998/10-B5		x	x		x	
H4630/09-9		x	x		x	
Nýrnakrabbamein						
H7421/12-2	x					
H7406/12-3		x	x			x
H7078/12-2	x					
H7057/12-A2		x	x			x
H7048/12-7	x					
Ristilkrabbamein						
H7433/12-A3	x					
H7431/12-1	x					
H7388/12-2	x					
H7357/12-3	x					
H7320/12-5	x					
Brjóstakrabbamein						
H7335/12-5		x	x			x
H7247/12-E5		x	x		x	
H7233/12-D6		x	x		x	
H7223/12-D2		x	x		x	
H7214/12-B7		x	x		x	
Briskrabbamein						
H4537/12-A4		x	x		x	
H4414/12-A8		x	x		x	
H3543/12-4		x		x		x
H6439/11-B5		x	x		x	
H5718/11-A6	x					
Magakrabbamein						
H5597/12-A5		x	x		x	
H4790/12-9		x		x	x	
H4240/12-6	x					
H2340/12-A4		x	x			x
H3644/11-A5		x	x		x	
Blöðruhálskirtilskrabbamein						
H7386/12-A10		x	x			x
H7208/12-A19	x					
H6902/12-A43	x					
H6592/12-A37	x					
H6394 /12-32	x					
Eggjastokkar - endometrioid						
H244/11-6		x	x		x	
H1568/11-A15		x	x			x
H2914/11-A7		x	x		x	
Eggjastokkar – serous						
H6733/11-A3		x	x		x	
H113/12-1		x	x			x
H1874/12-A4		x	x			x
H488011-2		x	x		x	
Eggjastokkar - mucinous						
H2331/11-A17	x					
H4585/12-A12		x	x		x	
H5046/09-A6		x	x		x	

CK20 - sýnanúmer	Neikvætt	Jákvætt	Sterkt	Veikt	Dreift	Staðbundið
Smáfrumukrabbamein - lunga						
H5158/07-A4	x					
H6058/09-4	x					
B64599/12	x					
B64534/12	x					
B63264/12	x					
Kirtilmyndandi krabbamein - lunga						
H7272/12-A9	x					
H7130/12-A4		x	x			x
H6798/12-A4	x					
H6750/12-A5	x					
H6144/12-A5	x					
H5663/12-A4 kirtilmyndnandi þáttur	x					
(H5663/12-A4 illa þroskaður þáttur)	x					
Flöguþekjukrabbamein - lunga						
H7384/12-F5	x					
H7275/12-i6	x					
H5663/12-B4 flöguþekju þáttur	x					
H4305/12-F4	x					
H4055/12-A4	x					
Stórfrumukrabbamein - lunga						
H800/12-A2	x					
H3180/09-B		x	x			x
H1474/08-A6	x					
H1998/10-B5	x					
H4630/09-9	x					
Nýrnakrabbamein						
H7421/12-2	x					
H7406/12-3	x					
H7078/12-2	x					
H7057/12-A2	x					
H7048/12-7	x					
Ristilkrabbamein						
H7433/12-A3		x	x			x
H7431/12-1		x	x			x
H7388/12-2		x	x			x
H7357/12-3		x	x			x
H7320/12-5		x	x			x
Brjóstakrabbamein						
H7335/12-5	x					
H7247/12-E5	x					
H7233/12-D6	x					
H7223/12-D2	x					
H7214/12-B7	x					
Briskrabbamein						
H4537/12-A4		x	x			x
H4414/12-A8	x					
H3543/12-4	x					
H6439/11-B5		x	x			x
H5718/11-A6		x	x			x
Magakrabbamein						
H5597/12-A5		x	x			x
H4790/12-9		x	x			x
H4240/12-6		x	x		x	
H2340/12-A4	x					
H3644/11-A5		x	x			x
Blöðruhálskirtilskrabbamein						
H7386/12-A10	x					
H7208/12-A19	x					
H6902/12-A43	x					
H6592/12-A37	x					
H6394 /12-32		x	x			x
Eggjastokkar - endometrioid						
H244/11-6		x	x			x
H1568/11-A15	x					
H2914/11-A7	x					
Eggjastokkar – serous						
H6733/11-A3	x					
H113/12-1	x					
H1874/12-A4	x					
H488011-2	x					
Eggjastokkar - mucinous						
H2331/11-A17		x	x			x
H4585/12-A12		x	x			x
H5046/09-A6		x	x			x